

MicroPatent® FullText Record[Help](#) [Close window](#)[Order/Download](#)[Family Lookup](#)[Front Page](#)[Legal Status](#)

JP3109599 A
ELECTRONIC STRINGED INSTRUMENT
WITH MEMORY FUNCTION
CASIO COMPUTER CO LTD

Abstract:

PURPOSE: To reproduce the performance of the stringed instrument with musical tones by successively storing the time information which indicates the timing of a string touch operation and the pitch information corresponding to a fingering operating position as performance information at every time when the string touch operation is detected by a detecting means.

[no drawing]

CONSTITUTION: The time information indicating the timing of the string touch operation and the pitch information corresponding to the detected fingering operation position are stored as performance information successively into a performance information memory means 33 at every time when the string touch operation is detected by an input section 31 consisting of a pitch switch and trigger switch as the detecting means. The performance contents of the stringed instrument by the fingering operations and the string touch operations can be stored in real time in this way and the stored contents can be reproduced afterward with the musical tones in real time.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

Inventor(s):

MANABE HIROSHI
MURATA YOSHIYUKI

Application No. JP1990224255A **Filed** 19900828 **Published** 19910509

Original IPC(1-7): G10H000100

G10H000138 G10H000100 G10H000100 G10H000138

Current IPC-R:

	invention		additional
Advanced	G10H000138	20060101	
	G10H000100	20060101	

Core	invention	additional
	G10H000138 20060101 G10H000100 20060101	

Priority:

JP1990224255A 19900828

Patents Cited:

→ JP57115596 A 19820719 ROBAATO DEI POURUSON [0]

Patents Citing This One:

→ JP3921817 B2 20070530

For further information, please contact:
[Tech Support](#) | [Billing](#) | [Sales](#)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3109599号

(P3109599)

(45) 発行日 平成12年11月20日 (2000. 11. 20)

(24) 登録日 平成12年 9 月14日 (2000. 9. 14)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:44)

1:01)

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/00

Z N A A

A

請求項の数39(全 55 頁)

(21) 出願番号

特願平3-508127

(86) (22) 出願日

平成3年4月18日 (1991. 4. 18)

(65) 公表番号

特表平5-504889

(43) 公表日

平成5年7月29日 (1993. 7. 29)

(86) 国際出願番号

P C T / E P 9 1 / 0 0 7 4 3

(87) 国際公開番号

W O 9 1 / 1 6 4 5 4

(87) 国際公開日

平成3年10月31日 (1991. 10. 31)

審査請求日

平成5年1月18日 (1993. 1. 18)

審判番号

平7-26368

審判請求日

平成7年12月4日 (1995. 12. 4)

(31) 優先権主張番号

9 0 4 0 1 0 5 4 . 3

(32) 優先日

平成2年4月18日 (1990. 4. 18)

(33) 優先権主張国

イギリス (G B)

(73) 特許権者 999999999

エヌ・ペー・イノヘネテイクス・エス・
アーベルギー国、ペー—9710・ヘント、ボツ
クス・4、インドウストリーパルク・ズ
バイナールデ・7

(72) 発明者

ロツサウ、リュディ

ベルギー国、ペー—2070・エケレン、ウ
イルヘフーベストラート・45

(74) 代理人

999999999

弁理士 川口 義雄 (外3名)

合議体

審判長 佐伯 裕子

審判官 藤田 節

審判官 眞壽田 順啓

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 16S及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される非ウイルス微生物検出用ハイブリダイゼーションプローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出すべき細菌種の16Sおよび23SrRNA遺伝子間の転写スペーサー領域の約15〜約100連続ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド配列から構成され、tRNA遺伝子配列を含まないプローブを用いて細菌種を特異的に検出する方法であって、16S及び23SrRNA遺伝子の3'末端及び5'末端の保存領域に割り当てられたプライマーを使用して標的部位を酵素増幅し、前記プローブを前記増幅標的部位へハイブリダイゼーションさせる工程を含む方法。

【請求項2】 前記オリゴヌクレオチド配列が、

検出すべき生物の16Sおよび23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列を、最近隣種のスペーサー領域配列と比較し、
検出すべき生物の16Sおよび23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域の約15〜約100の連続ヌクレオチドの配列であって、最近隣種のうちの少なくとも1種のスペーサー領域配列との間に少なくとも1つのミスマッチを有するヌクレオチド配列を選択することにより、選択される請求項1に記載の方法。

【請求項3】

一核酸グループ：グループ NGI1:

CGATGCGTCG TTATTCTACT TCQC	NGI1
GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG	NGI11C
GCGAAGUAGA AUAACGACGC AUCG	NGI11CR
CGAUGCGUCG UUAUUCUACU UCGC	NGI1R

グループ NGI2:

TTCGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NGI2
GTTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA	NGI21C
GUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA	NGI21CR
UUGGUUUACC UACCCGUUGA CUAAGUAAGC AAAC	NGI2R

グループ NMI1:

GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG	NMI1
CAGGGCGACG TCACACTTGA CC	NMI11C
CAGGGCGACG UCACACUUGA CC	NMI11CR
GGUCAAGUGU GACGUCGCCC UG	NMI1R

グループ NMI2:

GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC	NMI2
GACGTCACAC TTGACCAAGA AC	NMI21C
GACGUCACAC UUGACCAAGA AC	NMI21CR
GUUCUUGGUC AAGUGUGACG UC	NMI2R

グループ NMI3:

GCGTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC	NMI3
GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC	NMI31C
GCACAGUAGA UAGCUAUAAC GAACGC	NMI31CR
GCGUUCGUUA UAGCUAUCUA CUGUGC	NMI3R

グループ NMI4:

TGCGTTCGAT ATTGCTATCT ACTGTGCA	NMI4
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	NMI41C
UGCACAGUAG AUAGCAAUAU CGAACGCA	NMI41CR
UGCGUUCGAU AUUGCUAUCU ACUGUGCA	NMI4R

グループ NM15:

TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT

NM15

AATGGAACAGAATCCATTTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA

NM151C

AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCGACGUCACACUUGACCAAGAACAAAA

NM151CR

UUUUGUUCUUGGUCAAGUGUGACGUCGCCCUGAAUGGAUUCUGUCCAUI

NM15R

グループ NM16:

TTTGCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC

NM16

GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA

NM161C

GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA

NM161CR

UUUGCCUAA AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC

NM16R

グループ HD11:

TTATTATGCG CGAGGCATAT TG

HD11

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA

HD111C

CAAUAUGCCU CGCGCAUAAU AA

HD111CR

UUUAUAUGCG CGAGGCAUUA UG

HD11R

グループ BC11:

TTAAACATCT TACCAAAG

BC11

CTTTGGTAAG ATGTTTAA

BC111C

CUUUGGUAAG AUGUUUAA

BC111CR

UUAAACAUCU UACCAAAG

BC11R

グループ BC12:

TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA

BC12

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

BC121C

UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA

BC121CR

UUGAUGUUUA AACUUGCUG GUGGA

BC12R

グループ BPI1:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BPI1
AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG	BPI11C
AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG	BPI11CR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU	BPI1R

グループ HII1:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT	HII1
AAGTGCGGTC AATTTGATGC GT	HII11C
AAGUGCGGUC AAUUUGAUGC GU	HII11CR
ACGCAUCAAA UUGACCGCAC UU	HII1R

グループ HII2:

ACTTTGAAGT GAAAACTTAA AG	HII2
CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT	HII21C
CUUUAAGUUU UCACUUCAAA GU	HII21CR
ACUUUGAAGU GAAACUUAAG AG	HII2R

グループ SAI1:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T	SAI1
AACAATTTGA ACCTTTTCGAT T	SAI11C
AACAAUUUGA ACCUUUCGAU U	SAI11CR
AAUCGAAAGG UUCAAAUUGU U	SAI1R

グループ SAI2:

GGAAACCTGC CATTTGCGTC TT	SAI2
AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC	SAI21C
AAGACGCAAA UGGCAGGUUU CC	SAI21CR
GGAAACCUGC CAUUUGCGUC UU	SAI2R

グループ SAI3:

TCCACGATCT AGAAATAGAT TG TAGAA	SAI3
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA	SAI31C
UUCUACAAUC UAUUUCUAGA UCGUGGA	SAI31CR
UCCACGAUCU AGAAAUAGAU UGUAGAA	SAI3R

グループ SAI4:

TCTAGTTTTA AAGAACTAG GTT	SAI4
AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA	SAI4IC
AACCUAGUUU CUUUAACU AGA	SAI4ICR
UCUAGUUUUA AAGAAACUAG GUU	SAI4R

グループ SPI1:

GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA	SPI1
TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC	SPI1IC
UGCAUUACUU GGUGAUCUCU CAC	SPI1ICR
GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA	SPI1R

グループ SPI2:

AGGAACTGCG CATTGGTCTT	SPI2
AAGACCAATG CGCAGTTCCT	SPI2IC
AAGACCAAUG CGCAGUCCU	SPI2ICR
AGGAACUGCG CAUUGGUCUU	SPI2R

グループ SPI3:

GAGTTTATGA CTGAAAGGTC AGAA	SPI3
TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC	SPI3IC
UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC	SPI3ICR
GAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA	SPI3R

から選択される検出すべき細菌種の16Sおよび23SrRNA遺伝子間の転写スペーサー領域の核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含み、tRNA遺伝子配列を含まないことを特徴と

するプローブ。

【請求項4】1種以上のNeisseria gonorrhoeae株を検出するためのプローブであって、

一核酸グループ:

グループ NGI1:

CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC	NGI1
GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG	NGI1IC
GCGAAGUAGA AUAACGACGC AUCG	NGI1ICR
CGAUGCGUCG UUAUUCUACU UCGC	NGI1R

グループ NG12:

TTCGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NG12
GTTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA	NG121C
GUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA	NG121CR
UUGGUUUACC UACCCGUUGA CUAAGUAAGC AAAC	NG12R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項5】生物学的サンプル中で*Neisseria gonorrhoeae*株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る*Neisseria gonorrhoeae*株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項4に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項6】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項4に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約50℃の範囲及び／又は洗浄温度が約50℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG

HT及び／又はWT:50℃、

GUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA

HT及び／又はWT:50℃であることを特徴とする請求項5

に記載の生物学的サンプル中で*Neisseria gonorrhoeae*を検出するための方法。

【請求項7】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全ての*Neisseria gonorrhoeae*株をin vitro検出するためのキットであって、

—請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

—これらのプローブと多数の、好ましくは全ての*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

—同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が*Neisseria gonorrhoeae*に対して特異的であり且つ請求項4に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブと*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

—固体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

—該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

—酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項8】1種以上の*Neisseria meningitidis*株を検出するためのプローブであって、

一核酸グループ：

グループ NMI1:

GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG	NMI1
CAGGGCGACG TCACACTTGA CC	NMI1IC
CAGGGCGACG UCACACUUGA C	NMI1ICR
GGUCAAGUGU GACGUCGCCC UG	NMI1R

グループ NMI2:

GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC	NMI2
GACGTCACAC TTGACCAAGA AC	NMI2IC
GACGUCACAC UUGACCAAGA AC	NMI2ICR
GUUCUUGGUC AAGUGUGACG UC	NMI2R

グループ NMI3:

GCGTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC	NMI3
GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC	NMI3IC
GCACAGUAGA UAGCUAUAAC GAACGC	NMI3ICR
GCGUUCGUUA UAGCUAUCUA CUGUGC	NMI3R

グループ NMI4:

TGCGTTCGAT ATTGCTATCT ACTGTGCA	NMI4
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	NMI4IC
UGCACAGUAG AUAGCAAUAU CGAACGCA	NMI4ICR
UGCGUUCGAU AUUGCUAUCU ACUGUGCA	NMI4R

グループ NMI5:

TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT	NMI5
AATGGAACAGAATCCATTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA	NMI5IC
AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCGACGUCACACUUGACCAAGAACAAAA	NMI5ICR
UUUUGUUCUUGGUCAAGUGUGACGUCGCCCUGAAUGGAUUCUGUCCAUU	NMI5R

グループ NM16:

TTTGCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC	NM16
GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA	NM16IC
GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA	NM16ICR
UUUGCCUAAC AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC	NM16R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項9】生物学的サンプル中でNeisseria meningitidis株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るNeisseria meningitidis株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項8に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るNeisseria meningitidis株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項10】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アル

ブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項8に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40～58℃の範囲及び／又は洗浄温度が約40～58℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

CAGGGCGACG TCACACTTGA CC

HT及び／又はWT:45℃、

GACGTCACAC TTGACCAAGA AC

HT及び／又はWT:45℃、

GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC

HT及び／又はWT:40℃、

TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA

HT及び／又はWT:48℃、

TTTTGTTCTTGGTCAAGGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT

HT及び／又はWT:58℃、

GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA

HT及び／又はWT:50℃であることを特徴とする請求項9に記載の生物学的サンプル中でNeisseria meningitidis株を検出するための方法。

【請求項11】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのNeisseria meningitidis株をin vitro検出するためのキットであって、一請求項8に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、
一これらのプローブと多数の、好ましくは全てのNeisseria meningitidis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がNeisseri

a meningitidisに対して特異的であり且つ請求項8に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、
一これらのプローブとNeisseria meningitidis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
一固体支持体に固定された請求項8に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、
一該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
一酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブとNeisseria meningitidis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

ー核酸グループ：

グループ HDI1：

TTATTATGCG CGAGGCATAT TG
CAATATGCCT CGCGCATAAT AA
CAAUUAUGCCU CGCGCAUAAU AA
UUAUUAUGCG CGAGGCAUAAU UG

HDI1

HDI1IC

HDI1ICR

HDI1R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項13】生物学的サンプル中でHaemophilus ducreyi株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るHaemophilus ducreyi株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項12に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るHaemophilus ducreyi株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項14】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項12に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40℃の範囲及び／又は洗浄温度が約40℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA

HT及び／又はWT:40℃であることを特徴とする請求項13に記載の生物学的サンプル中でHaemophilus ducreyiを

【請求項12】1種以上のHaemophilus ducreyi株を検出するためのプローブであって、

検出するための方法。

【請求項15】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのHaemophilus ducreyi株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項12に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのHaemophilus ducreyi株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がHaemophilus ducreyiに対して特異的であり且つ請求項12に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー固体支持体に固定された請求項12に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ー該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項16】1種以上のBranhamella catarrhalis株を検出するためのプローブであって、

ー核酸グループ：

グループ BC11:

TTAAACATCT TACCAAAG	BC11
CTTTGGTAAG ATGTTTAA	BC11IC
CUUUGGUAAG AUGUUUAA	BC11ICR
UUAAACAUCU UACCAAAG	BC11R

グループ BC12:

TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA	BC12
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA	BC12IC
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BC12ICR
UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA	BC12R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項17】生物学的サンプル中でBranhamella catarrhalis株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るBranhamella catarrhalis株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項16に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るBranhamella catarrhalis株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項18】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項16に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約30〜42℃の範囲及び／又は洗浄温度が約30〜42℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

CTTTGGTAAG ATGTTTAA

HT及び／又はWT:30℃

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

HT及び／又はWT:42℃であることを特徴とする請求項17に記載の生物学的サンプル中でBranhamella catarrhalis株を検出するための方法。

【請求項19】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのBranhamella catarrhalis株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項16に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのBranhamella catarrhalis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がBranhamella catarrhalisに対して特異的であり且つ請求項16に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとBranhamella catarrhalis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー固体支持体に固定された請求項16に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ー該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素

的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
一酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブ
とBranhamella catarrhalis株のDNA及び／又はRNAとの
間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可
能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分
と、

一核酸グループ：

グループ BPI1：

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT

BPI1

AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG

BPI11C

AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG

BPI11CR

CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU

BPI1R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核
酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むこ
とを特徴とするプローブ。

【請求項21】生物学的サンプル中でBordetella pert
ussis株を検出するための方法であって、場合によりプ
ローブの標的配列にフランキングする2種のプライマ
ー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマ
ーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた
検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切
な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにし
ておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル
中に存在し得るBordetella pertussis株の相補的核酸
との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で
請求項20に記載のプローブと接触させる段階と、特にサ
ンプル中に存在し得るBordetella pertussis株のDNA及
びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハ
イブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを
含むことを特徴とする方法。

【請求項22】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×
SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウ
ム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イ
オン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アル
ブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの
剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄
媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱
イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプ
ローブが請求項20に記載のプローブのいずれかであり、ハ
イブリダイゼーション温度が約55℃の範囲及び／又は洗
浄温度が約55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的
配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）
及び洗浄温度（WT）が夫々、

AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG

HT及び／又はWT:55℃であることを特徴とする請求項21

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ
リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と
するキット。

【請求項20】1種以上のBordetella pertussis株を
検出するためのプローブであって、

に記載の生物学的サンプル中でBordetella pertussis
を検出するための方法。

【請求項23】生物学的サンプル中で多数、好ましくは
全Bordetella pertussis株をin vitro検出するための
キットであって、

一請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された
少なくとも1種のプローブと、

一これらのプローブと多数の、好ましくは全てのBordet
ella pertussis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブ
リダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液
又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハ
イブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを
適時検出するための手段とを含むか、又は

一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がBordetel
la pertussisに対して特異的であり且つ請求項20に記
載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも
2種のプローブと、

一これらのプローブとBordetella pertussis株のDNA及
び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生
じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するた
めに必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ
リッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
一固体支持体に固定された請求項20に記載のプローブの
いずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵
素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブ
とBordetella pertussis株のDNA及び／又はRNAとの間
にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能
な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ
リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と
するキット。

【請求項24】1種以上のHaemophilus influenzae株

ー核酸グループ:

グループHII1:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT

AAGTGC GGTC AATTTGATGC GT

AAGUGCGGUC AAUUGAUGC GU

ACGCAUCAAA UUGACCGCAC U

グループHII2:

ACTTTGAAGT GAAACTTAA AG

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT

CUUUAAGUUU UCACUUCAAA GU

ACUUUGAAGU GAAACUUAA AG

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項25】生物学的サンプル中でHaemophilus influenzae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項24に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項26】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項24に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35~55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約35~55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

を検出するためのプローブであって、

HII1

HII1IC

HII1ICR

HII1R

HII2

HII2IC

HII2ICR

HII2R

AAGTGC GGTC AATTTGATGC GT

HT及び/又はWT:55℃、

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT

HT及び/又はWT:35℃であることを特徴とする請求項25に記載の生物学的サンプル中でHaemophilus influenzaeを検出するための方法。

【請求項27】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのHaemophilus influenzae株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのHaemophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がHaemophilus influenzaeに対して特異的であり且つ請求項24に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとHaemophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー固体支持体に固定された請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ー該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
 ー酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブとHaemophilus influenzae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分

ー核酸グループ：

グループ SPI1:

GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA

SPI1

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

SPI1IC

UGCAUUACUU GGUGAUCUCU CAC

SPI1ICR

GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA

SPI1R

グループ SPI2:

AGGAACTGCG CATTGGTCTT

SPI2

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

SPI2IC

AAGACCAAUG CGCAGUCCU

SPI2ICR

AGGAACUGCG CAUUGGUCUU

SPI2R

グループ SPI3:

GAGTTTATGA CTGAAAGGTC AGAA

SPI3

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC

SPI3IC

UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC

SPI3ICR

GAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA

SPI3R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項29】生物学的サンプル中でStreptococcus pneumoniae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るStreptococcus pneumoniae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項28に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るStreptococcus pneumoniae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項30】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×

と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項28】1種以上のStreptococcus pneumoniae株を検出するためのプローブであって、

SSC（ $1 \times \text{SSC} = 0.15\text{M NaCl}, 0.015\text{M}$ クエン酸ナトリウム、 $\text{pH}7.0$ ）、約25mMのリン酸緩衝液 $\text{pH}7.1$ 、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液 $\text{pH}7.1$ 及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項28に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約45℃の範囲及び／又は洗浄温度が約45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

HT及び／又はWT:45℃、

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

HT及び／又はWT:45℃、

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC

HT及び／又はWT:45℃であることを特徴とする請求項29に記載の生物学的サンプル中でStreptococcus pneumoniaeを検出するための方法。

【請求項31】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのStreptococcus pneumoniae株をin vitro検出するためのキットであって、
—請求項28に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、
—これらのプロープと多数の、好ましくは全てのStreptococcus pneumoniae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
—同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がStreptococcus pneumoniaeに対して特異的であり且つ請求項28に記載のプロープのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプロープと、

—核酸グループ：

グループ SAI1:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T	SAI1
AACAATTTGA ACCTTTCGAT T	SAI11C
AACAAUUUGA ACCUUUCGAU U	SAI11CR
AAUCGAAAGG UUCAAUUGU U	SAI1R

グループ SAI2:

GGAAACCTGC CATTTGCGTC TT	SAI2
AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC	SAI21C
AAGACGCAAA UGGCAGGUUU CC	SAI21CR
GGAAACCUGC CAUUUGCGUC UU	SAI2R

グループ SAI3:

TCCACGATCT AGAAATAGAT TGTAGAA SAI3
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA SAI31C
UUCUACAAUC UAUUUCUAGA UCGUGGA SAI31CR
UCCACGAUCU AGAAAUAGAU UGUAGAA SAI3R

—これらのプロープとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
—固体支持体に固定された請求項28に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、
—該プロープの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
—酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプロープとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項32】1種以上のStreptococcus agalactiae株を検出するためのプロープであって、

グループ SAI4:

TCTAGTTTTA AAGAACTAG GTT

AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA

AACCUAGUUU CUUUAACU AGA

UCUAGUUUA AAGAAACUAG GUU

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項33】生物学的サンプル中でStreptococcus agalactiae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るStreptococcus agalactiae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項32に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るStreptococcus agalactiae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項34】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項32に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35～45℃の範囲及び／又は洗浄温度が約35～45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

AACAATTTGA ACCTTTCGAT T

HT及び／又はWT:35℃、

AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC

HT及び／又はWT:45℃、

TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA

HT及び／又はWT:45℃、

AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA

SAI4

SAI4IC

SAI4ICR

SAI4R

HT及び／又はWT:37であることを特徴とする請求項33に記載の生物学的サンプル中でStreptococcus agalactiaeを検出するための方法。

【請求項35】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのStreptococcus agalactiae株をin vitro検出するためのキットであって、

一請求項32に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一これらのプローブと多数の、好ましくは全てのStreptococcus agalactiae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がStreptococcus agalactiaeに対して特異的であり且つ請求項32に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

一これらのプローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一固体支持体に固定された請求項32に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項36】生物学的サンプル中でCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための方法であって、プローブの標的配列にフランキングする2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を応用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションでき

るようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するためのプローブであって、プローブが適切な条件でCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli由来のDNA及び／又はRNAのみとハイブリダイズし、他の生物由来のDNA及び／又はRNAとはハイブリダイズしないという条件下で、図10に示す16S-23SrRNAスペーサー配列から選択される15～最大数の連続したクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項37】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株をin vitro検出するためのキットであって、
—1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するためのプローブであって、プローブが適切な条件でCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli由来のDNA及び／又はRNAのみとハイブリダイズし、他の生物由来のDNA及び／又はRNAとはハイブリダイズしないという条件下で、図10に示す16S-23SrRNAスペーサー配列から選択される15～最大数の連続したヌクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、
—これらのプローブと多数、好ましくは全Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
—同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliに対して特異的であり且つ前記プローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、
—これらのプローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
—固体支持体に固定された前記プローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、
—該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素

的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
—酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項38】検出すべき微生物に特異的な請求項3、4、8、12、16、20、24、28及び32のいずれか一項に記載のプローブを使用して生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するための方法であって、好ましくはプローブ領域にフランキングする少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する（標的配列を含む）DNA及び／又はRNAを標識し、増幅した標的配列と膜上のプローブとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプローブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出することを特徴とする方法。

【請求項39】生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するためのキットであって、
—検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした請求項3、4、8、12、16、20、24、28及び32のいずれか一項に記載のプローブの少なくとも1種と、
—該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
—酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと検出すべき微生物のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

本発明は、ハイブリダイゼーション手順により生物学的サンプル中で非ウイルス微生物の特異的検出に使用するための、リボソームリボ核酸（rRNA）遺伝子、特に16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される核酸プローブに係る。

ここ10年間に多数の微生物で目覚ましい進歩が遂げられているが、現在使用されている診断手順はまだ手間がかかり、非感受性であり、非特異的である。これらの欠点の多くは核酸プローブを使用することにより解決することができる。これらの核酸プローブの例としては、全ゲノムデオキシリボ核酸（DNA）、プラスミド、リボプ

ローブ又は合成オリゴヌクレオチドを挙げることができ、これらのプローブは生物学的サンプル中に存在するゲノムDNA、メッセンジャーRNA又は安定RNA種を標的にすることができる。必ずしもそうでなくてもよいが、合成オリゴヌクレオチドを使用すると好適である。オリゴヌクレオチドは化学的方法を使用して迅速に大量に合成することができ、貯蔵寿命が長く、容易に精製及び標識できる。

DNAプローブ技術を使用して微生物を確実に診断にするためには、使用されるプローブは高特異性（即ち他の生物に由来する核酸と交差反応すべきでない）且つ高感度（即ち検出しようとする生物の全部ではないとしてもほとんどの株がプローブと反応すべきである）であるべきである。従って、好適標的配列は以下の特徴を有するべきである。

(i) 配列は該当生物の各株のゲノム中に存在すべきである。

(ii) 進化による配列の相違は、一方では該当種を他の密接に関連する種から区別できるようにするために十分な配列相違があり、他方では使用されるプローブで該当種の全株を検出できるようにするために十分な配列保存があるように構成されるべきである。

種特異的プローブは多数の生物について記載されている。最近の文献ではTenover, Clin. Microbiol. Rev. 1:82-101, 1988を参照されたい。

しかしながら、ゲノム中のどの遺伝子から特異的プローブ配列を誘導できるのかについては不明である。プローブ開発にあたっては、最終的に対象生物に対して特異的になるようなフラグメントを得るために大規模な選択手順に従わなければならないことが多かった (Korolik et al., J. Gen. Microbiol. 134:521-529, 1988; Grimon et al., J. Clin. Microbiol. 21:431-437, 1985; Welch et al., Nucl. Acids Res. 14:10027-10044, 1986; Donegan et al., Mol. Cell. Probes 3:13-26, 1989; Beaulieu and ROY, Abstract nr D249, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 1989)。ほとんどの場合、特異的フラグメントが誘導される遺伝子の機能又は実態は解明されておらず、別の特異的プローブが所望される毎にスクリーニング手順を手探りで繰り返さなければならない。上記基準を満たし且つ偏在する遺伝子が厳密に同定されるならば、時間と手間にかかる選択が不要になる。

16S又は23SrRNA遺伝子は、既に記載されている方法を使用して配列を容易に得ることができ、種特異的検出に使用可能なこれらの高保存性遺伝子内に種々の領域が存在することが知られているので、プローブ開発に頻用されている。しかしながら、生物によっては進化による核酸配列保存性が非常に高いため、例えば16S及び23SrRNA遺伝子から高特異性で高感度のプローブを誘導できない場合がある。更に、これらの遺伝子の保存性の結果、標

的配列のみで1又は少数のミスマッチに基づいて2種の生物を区別しなければならないことが多くなり、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーが必要になる。これらの条件から少しでも外れると、誤認の恐れがある。

従って、16S及び23SrRNA遺伝子から特異的プローブを誘導することができなかった種を含むほとんどの生物に種特異的なプローブを開発することができ、好ましくはより広いストリンジェンシー範囲を有する偏在遺伝子の特徴付けることができるならば、非常に有利である。

各細胞生物は、その転写物がリボソームの機能とタンパク質の合成とに不可欠であるため、リボソームRNAシストロンを有する。一般に、遺伝子はゲノム中に多重コピー存在する。真正細菌では16SrRNA遺伝子 [小サブユニットrRNA (srRNA) に同じ] はrRNAシストロンの5'末端に位置し、23SrRNA [大サブユニットrRNA (1rRNA) に同じ] が後続する。5SrRNA遺伝子はシストロンの3'末端に位置する。16S、23S及び5S遺伝子はスペーサー領域により分離され、これらのスペーサー領域には転写後プロセッシングに関与する転移RNA (tRNA) 遺伝子及びシグナル配列が位置し得る。まず最初にrRNAシストロンは前駆物質RNA分子として転写される。この一次転写物はエンドリボヌクレアーゼ及びエキソリボヌクレアーゼにより更にプロセッシングされ、成熟産物を生成する。従って、スペーサー領域配列は生物のゲノム中のみに存在するのではなく、前駆体RNA分子及びプロセッシング産物中にも存在する。真正細菌rRNAシストロンの構造及びプロセッシングは、Gegenheimer and Apirion, Microbiol. Rev. 45:502-541, 1981に詳細に記載されている。

真核生物の核ゲノム中の状況は多少異なり、srRNA及び1rRNA間に5.8SrRNA遺伝子が位置しており、5SrRNA遺伝子は別個の長いタンデムアレー中に配置されている (Perry, Annu. Rev. Biochem. 45:605-629, 1976; Long and Dawid, Annu. Rev. Biochem. 49:727-764, 1980)。しかしながら、真核生物のミトコンドリア又はクロロプラスト中のrRNAシストロンは実際に原核生物である (Borst and Grivell, Nature 290:443-444, 1981)。

文献には非常に少数の真核又は原核生物のスペーサー領域の核酸配列しか記載されていない (例えばYoung et al., J. Biol. Chem. 254:3264-3271, 1979; 及びMartens et al., System. Appl. Microbiol. 9:224-230, 1987)。これらのデータから核酸配列保存を確実に予想することはできず、従って、特異的プローブの選択のためのスペーサー領域の適応については全く推定することができない。

より詳細には、真核生物に関して、生物学的サンプル中で微生物の検出に使用され、16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導されるハイブリダイゼーションプローブは未だに報告されていない。真核生物の大小サブユニットrRNA遺伝子間の対応するスペーサー領域に

についても何ら説明されていない。

真核生物に関する限り、リボソーム遺伝子スペーサーからクローニングされたフラグメントの使用がLeishmaniaに関する分類学的研究に記載されている(Ramirez and Guevara, Mol. Bioch. Parasitol. 22:177-183, 1987)。しかしながら、使用された領域及び研究のアプローチは、特に以下に述べる理由により、小rRNA及び大rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導されるプローブを使用するために当業者には無益である。

(i) Ramirez及びGuevaraにより使用されたリボソーム遺伝子スペーサーはsrRNA及び1rRNA間のスペーサー領域ではなく、2つの隣接するrRNAシストロン間に存在する配列であり、このようなスペーサーは真核生物ではrRNAシストロンの反復単位間にしか見いだされず、srRNA及び1rRNA遺伝子間の内部スペーサーには無関係である。

(ii) 遺伝子スペーサーフラグメントを使用するLeishmania分類群間の区別は、制御フラグメントパターンを比較することにより得られ、使用されるフラグメントは非特異的である。

従って、サザンブロット分析を用いずに簡単なハイブリダイゼーションプロトコルを使用してフラグメントで区別することは不可能である。

リボソーム遺伝子スペーサー中に高特異的プローブが存在し得るということも立証されていない。

従って、本発明の目的は、細菌種のような特定生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される種特異的プローブを提供することである。

本発明の別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための、16S-23SrRNAスペーサー領域から誘導されるDNAプローブを提供することである。

本発明の更に別の目的は、ドットスポット、鎖置換、コンペティション、サンドイッチ又は逆ハイブリダイゼーション試験のようなハイブリダイゼーション試験により生物学的サンプル中でNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための、16S-23SrRNA遺伝子スペーサー領域から誘導されるDNAプローブを提供することである。本発明の更に別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCa

mpylobacter coli株のin vitro診断用プローブ及び簡単な診断方法を提供することである。

本発明は、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定のには細菌のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

本発明はより詳細には、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定のには細菌のrRNA遺伝子間、特に16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域の約15ヌクレオチド〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくはスペーサー領域の約15〜約100ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

以下の文中で「スペーサー領域」なる用語は、rRNA遺伝子間、より特定のには16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域を意味する。

本発明は、検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定のには細菌に固有であるように選択されたrRNA遺伝子間のスペーサー領域の配列にハイブリダイズするために十分相補的なオリゴヌクレオチドを構築する段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアッセイ用プローブに係り、rRNA遺伝子間のスペーサー領域の前記配列は、

一* 目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列を、最近隣種のrRNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較し、

* 最近隣種のうちの少なくとも1種のrRNA遺伝子間のスペーサー領域との間に少なくとも1つのミスマッチを有する目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくはスペーサー領域の約15〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドの配列を選択することにより、又は

一* 短縮スペーサー領域を得るように、目的生物のスペーサー領域からtRNA遺伝子及び場合によりシグナル配列を欠失させ、

* 少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15〜スペーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸(DNA及び/又はRNA)と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試験錯誤により決定することにより選択される。

本発明は特に、rRNA遺伝子間のスペーサー領域が16SrRNA遺伝子及び23SrRNA遺伝子間の転写スペーサー領域であるようなプローブに係る。

追って概説するように、数種の微生物のスペーサー領域をクローニングし、配列決定及び比較した。比較の結果、スペーサー領域の核酸配列は高保存性のrRNA遺伝子に比較して半保存性(semi-conserved nature)であることが判明した。従って、スペーサー領域はrRNA遺伝子それ自体よりもプローブの開発に好適である。図1、2及び10は、高度に関連する生物(例えば同一遺伝種からの高度に関連する株)間に高度の配列相同性があること

を示す。図3及び7に示すように、並の関連性を有する生物間では多少大きい配列相違が認められた。図4～6に示すように、関連性の低い種間では顕著な配列相同性は(tRNA配列を除き)全くないことが判明した。

下記表では、異なる株の16SrRNA配列の相同値(16S hom)(配列相同%)を、スペーサー領域の対応する相

同値(スペーサーhom)に比較した。相同値(16S hom及びスペーサーhom)は、Intelligentics Inc.及びGen ofit SA製PC Geneソフトウェア(1989年4月20日リリース6.01)を使用して計算した。比較したヌクレオチドの総数を括弧内に示す。この結果から明らかなように、スペーサー領域は16SrRNA分子よりも低保存性である。

比較株		16S	スペーサー
株1	株2	hom	hom
<u>N. gonorrhoeae</u>	<u>N. gonorrhoeae</u>	99.9%	100%
NCTC 8375	ITG 4367	(1434)	(335)
<u>B. pertussis</u>	<u>B. bronchiseptica</u>	100%	98.1%
ATCC 10380	NCTC 452	(417)	(582)
<u>N. gonorrhoeae</u>	<u>N. meningitidis</u>	99%	93.5%
NCTC 8375	NCTC 10025	(1452)	(603)
<u>B. catarrhalis</u>	<u>M. nonliquefaciens</u>	97.9%	87.1%
ITG 4197	ATCC 19975	(1244)	(498)
<u>B. pertussis</u>	<u>N. gonorrhoeae</u>	86.3%	58.4%
ATCC 10380	NCTC 8375	(998)	(582)
<u>B. catarrhalis</u>	<u>N. gonorrhoeae</u>	83.8%	68.1%
ITG 4197	NCTC 8375	(1485)	(498)
<u>H. ducreyi</u>	<u>E. coli</u>	88.3%	67.1%
CIP 541		(1498)	(346)

この結果、関連する対象病原種(即ちNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni

及びCampylobacter coli株)のスペーサー領域配列から種特異性及び感度の高いプローブを誘導することができた。16S及び/又は23SrRNA分子中で高特異性プローブを見いだすことができなかったNeisseria meningitidis及びBordetella pertussis種のスペーサー領域からも

有用なプローブを誘導することができた。本明細書に記載する以外の種（例えば他のCampylobacter種、他のHaemophilus種、Actinobacillus種、Bacteroides種、Chlamydia種等）の特異的プローブも同様にスペーサー領域配列から誘導できる。

16S及び23SrRNA遺伝子間の転写スペーサー領域から誘導されるプローブの標的は、検出すべき細胞中に存在するゲノムDNA及び前駆体RNA分子である。前駆体RNA分子は一本鎖であり、多重コピー存在し得るので、前駆体RNA分子を検出すると有利である。他方、DNA分子はRNA分子よりも酵素分解を非常に受けにくい。従って、ハイブリダイゼーション前にRNA分解を生じないように十分に生物学的サンプルを処理及び／又は保存できない場合には、DNAターゲッティングが好適である。

16S-23SrRNA転写スペーサー領域から誘導されるプローブの別の利点は、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）を使用する酵素増幅後に標的検出する点にある。多くの微生物のスペーサー領域は例えば、夫々16S及び23SrRNA遺伝子

の3'末端及び5'末端の保存領域に割り当てられた同一プライマーを使用して酵素的に増幅され得る。rRNA遺伝子の高保存性を利用すると、同一試薬及びプロトコルを使用して好適には同時に多数の生物のスペーサー領域を増幅し、その後、該当生物のスペーサー領域に特異的にターゲッティングするプローブを使用して増幅フラグメントを検出することができる。同時に増幅されたフラグメントの同時且つ特異的検出のために有利な方法は、逆ハイブリダイゼーションである。

スペーサー領域は保存配列により夾叉されているので、この領域をPCR技術によりクローニング及び配列決定するのは簡単であり、同一プロトコルを多種の生物に適用することができる。従ってスペーサー領域の配列は、16S又は23SrRNAに割り当てられた保存プライマーを使用するrRNA遺伝子の酵素的増幅により得られる。スペーサー領域を占めるフラグメントの増幅に使用可能な塩基プライマー対の例を以下に挙げる。

プライマー対 1 : TGGCTCAGAT TGAACGCTGG CGGC及び

CCTTTCCCTC ACGTACTGG T

プライマー対 2 : TGGGTGAAGT CGTAACAAGG TA及び

CACGTCCTTC CTCGCCT。

増幅したフラグメントをそのまま、又は固有限制部位を認識する制限酵素で消化後に2つのサブフラグメントとしてクローニングすることができる。M13でPCR産物をクローニングするための戦略は、Medlin et al. (Gene 71:491-499, 1988) に記載されている。

同一戦略を使用してプラスミドベクターでクローニングすることができる。このアプローチによると、塩基プライマーの5'末端から固有限制部位を含むヌクレオチド配列を伸長させ、フラグメントを順方向にクローニングする。プラスミドベクターにクローニング後、ジデオキシシチエンターミネーション法を使用してスペーサー領域を配列決定することができる。

このアプローチはゲノムバンク又は選択された制限エンドヌクレアーゼフラグメントを使用する従来のクローニング手順に比較して著しく簡単で時間がかからない。

クローニングせずにPCRフラグメントで配列決定反応を直接実施すると、より迅速に配列情報が得られるが、クローン化フラグメントから生成された配列情報のほうがより正確且つ完全である。PCRフラグメントに比較して、クローン化遺伝子フラグメントは容易に大量精製できるので、配列決定段階を明瞭に読み取ることができる。プローブ配列中に1つでもミスマッチがあるとプローブは無効になるので、配列を得る際には速度よりも精度のほうが著しく優先される。

上記に要約したアプローチによりスペーサー配列を得る容易さを考慮すると、プローブが所望される生物のスペーサー領域のヌクレオチド配列を最近隣種のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較するのが、特異的プローブ配列を誘導するために好適な方法である。

最近隣種とは、DNA相同の点で最も密接に関連することが知られており且つ該当生物と区別されなければならない分類群を意味する。

該当成分の分類学的位置に依存して、最近隣種は該当生物に非常に高度の関連し、結合度が75%以上であつてもよいし、関連度が低く、有効なDNA相同百分率を示さなくてもよい。初期再生レート法では結合度の値は約30%以下であり、固相DNA:DNAハイブリダイゼーション法ではDNA相同は更に低く、10~20%の結合度になる。

一方、該当生物を区別すべき最近隣種のヌクレオチド配列を入手できない場合には、試行錯誤により特異的プローブを選択することができる。その場合、スペーサー領域の任意の場所に位置し得る特異的プローブ領域を各生物毎に実験的に定義しなければならない。tRNA遺伝子やシグナル配列のようなスペーサー領域中のほんのわずかの領域しかプローブ領域として先験的に除外できない場合もある。しかしながら、16S-23SrRNAスペーサー領域は一般に小さく、通常900bp以下であるので、大規模にスクリーニングしなくても良好なプローブ配列を容易

に見いだすことができる。

例えば16S及び23SrRNA遺伝子間の700bpのスペーサー領域の場合、tRNA及びシグナル配列を欠失させることにより得られる「短縮」スペーサー領域は約500bpであり得る。

本明細書中に使用する「生物学的サンプル」なる用語は、該当標的配列が探査される臨床サンプル（膿、痰、血液、尿等）、環境サンプル、細菌コロニー、汚染又は純粋培養物、精製核酸等のような試料を意味する。

本明細書中に使用する「rRNA遺伝子スペーサー領域か

ら誘導」なる用語は、該当プローブがDNAフラグメントから形成されるかRNAフラグメントから形成されるかに関係なく、又はクローン化フラグメント（DNAの場合）から構成されるか又は合成オリゴヌクレオチドから構成されるかに関係なく、該当プローブがゲノム又は転写RNA分子中に通常存在するリボソームRNA遺伝子間のスペーサー領域に配置された配列とハイブリダイズすることを意味する。

*Neisseria gonorrhoeae*株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー 核 酸 グ ル ー プ ：

グ ル ー プ NGI1：

CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC	NGI1
GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG	NGI1IC
GCGAAGUAGA AUAACGACGC AUCC	NGI1ICR
CGAUGCGUCG UUAUUCUACU UCGC	NGI1R

グ ル ー プ NGI2：

TTCGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NGI2
GTTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAG CGAA	NGI2IC
GUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA	NGI2ICR
UUGGUUUACC UACCCGUUGA CUAAGUAAGC AAAC	NGI2R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

ー 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

*Neisseria meningitidis*株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

－ 核 酸 グ ル ー プ ー :

グ ル ー プ NM11:

GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG	NM11
CAGGGCGACG TCACACTTGA CC	NM11IC
CAGGGCGACG UCACACUUGA CC	NM11ICR
GGUCAAGUGU GACGUCGCCC UG	NM11R

グ ル ー プ NM12:

GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC	NM12
GACGTCACAC TTGACCAAGA AC	NM12IC
GACGUCACAC UUGACCAAGA AC	NM12ICR
GUUCUUGGUC AAGUGUGACG UC	NM12R

グ ル ー プ NM13:

GCGTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC	NM13
GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC	NM13IC
GCACAGUAGA UAGCUAUAAAC GAACGC	NM13ICR
GCGUUCGUUA UAGCUAUCUA CUGUGC	NM13R

グ ル ー プ NM14:

TGCGTTCGAT ATTGCTATCT ACTGTGCA	NM14
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	NM14IC
UGCACAGUAG AUAGCAAUAU CGAACGCA	NM14ICR
UGCGUUCGAU AUUGCUAUCU ACUGUGCA	NM14R

グループ NM15:

TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT

NM15

AATGGAACAGAATCCATTTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA

NM15IC

AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCGACGUCACACUUGACCAAGAACAAAA

NM15ICR

UUUUGUUCUUGGUC AAGUGUGACGUCGCCCU GA AUGGAUUCUGUCCA UU

NM15R

グループ NM16:

TTTGCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC

NM16

GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA

NM16IC

GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA

NM16ICR

UUUGCCUAA C AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC

NM16R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれかにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

一・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Branhamella catarrhalis株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー 核 酸 グ ル ー プ ；

グ ル ー プ BCI1:

TTAAACATCT TACCAAAG	BCI1
CTTTGGTAAG ATGTTTAA	BCI11C
CUUUGGUAAG AUGUUUAA	BCI11CR
UUAAACAUCU UACCAAAG	BCI1R

グ ル ー プ BCI2:

TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA	BCI2
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA	BCI21C
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BCI21CR

UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA

BCI2R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は
下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

ー 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Haemophilus ducreyi株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー 核 酸 グ ル ー プ ；

グ ル ー プ HDI1:

TTATTATGCG CGAGGCATAT TG	HDI1
CAATATGCCT CGCGCATAAT AA	HDI11C
CAAU AUGCCU CGCGCAUAAU AA	HDI11CR

UUUUUAUGCC CGAGGCADAU UC

HDI1R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は
下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

ー 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列

を含む。

Haemophilus influenzae株を検出するための本発明

のハイブリダイゼーションプローブは、

－ 核 酸 グ ル ー プ ー :

グ ル ー プ HII1:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT	HII1
AAGTGCGGTC AATTTGATGC GT	HII1IC
AAGUGCGGUC AAUUUGAUGC GU	HII1ICR
ACGCAUCAAA UUGACCGCAC UU	HII1R

グ ル ー プ HII2:

ACTTTGAAGT GAAAACCTTA AG	HII2
CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT	HII2IC
CUUUAAAGUUU UCACUUCAAA GU	HII2ICR
ACUUUGAAGU GAAAACUAAA AG	HII2R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

－ 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Bordetella pertussis株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

－ 核 酸 グ ル ー プ ー :

グ ル ー プ BPI1:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BPI1
AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG	BPI1IC
AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG	BPI1ICR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU	BPI1R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修

飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

－ 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチド

が付加もしくは除去されているか、

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列

を含む。

Streptococcus pneumoniae株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー 核 酸 グ ル ー プ ：

グ ル ー プ BPI1：

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BPI1
AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTCG	BPI1IC
AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG	BPI1ICR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU	BPI1R

グ ル ー プ SPI2：

AGGAACTGCG CATTGGTCTT	SPI2
AAGACCAATG CGCAGTTCCT	SPI2IC
AAGACCA AUG CGCAGUCCU	SPI2ICR
AGGAACUGCG CAUUGGUCUU	SPI2R

グ ル ー プ SPI3：

GAGTTTATGA CTGAAAGGTC AGAA	SPI3
TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC	SPI3IC
UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC	SPI3ICR

GAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

- ー 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

SPI3R

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Streptococcus agalactiae株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー 核 酸 グ ル ー プ ；

グ ル ー プ SAI1:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T	SAI1
AACAATTTGA ACCTTTCGAT T	SAI1IC
AACAAUUUGA ACCUUUCGAU U	SAI1ICR
AAUCGAAAGG UUCAAAUUGU U	SAI1R

グ ル ー プ SAI2:

GGAAACCTGC CATTTGCGTC TT	SAI2
AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC	SAI2IC
AAGACGCAAA UGGCAGGUUU CC	SAI2ICR
GGAAACCGGC CAUUUGCGUC UU	SAI2R

グ ル ー プ SAI3:

TCCACGATCT AGAAATAGAT TGTAGAA	SAI3
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA	SAI3IC
UUCUACAAUC UAUUUUCUAGA UCGUGGA	SAI3ICR
UCCACGAUCU AGAAAUAGAU UGUAGAA	SAI3R

グ ル ー プ SAI4:

TCTAGTTTTA AAGAACTAG GTT	SAI4
AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA	SAI4IC
AACCUAGUUU CUUUAAAACU AGA	SAI4ICR

UCUAGUUUUA AAGAAACUAG GUU

SAI4R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は
下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修

飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、
ー・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチド

が付加もしくは除去されているか、

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

本発明は更に、適切な条件でプローブが*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*由来のDNA及び／又はRNAと特異的にハイブリダイズするという条件下で、図10に示し16S-23SrRNAスペーサー配列から誘導される15～最大数のヌクレオチドの配列、又はTがUで置換された対応配列、又はその相補配列、又はTがUで置換された対応する相補配列を含む*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*株を検出するためのハイブリダイゼーションプローブに係る。

グループNGI1, NGI2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4に示した配列中、アルファベットは以下のヌクレオチドを表す。

A: アデニル残基

C: シチジル残基

G: グアニル残基

T: チミジル残基

U: ウラシル残基。

「標的」なる用語は、上記に定義したグループNGI1, NGI2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4の配列のいずれかに相補的な配列を意味する。

本発明のプローブが上記配列の片側又は両側に核酸延長部（例えばクローニングベクターの核酸フラグメント又は該クローニングベクターから前記プローブを切断することにより得られるリンカーフラグメント）を含む場合、このような延長部は、追って定義するような本発明の方法により試験され得る微生物のDNA中で上記標的以外の任意の対応する相補的核酸配列とハイブリダイズしないように選択されるべきである。このようなハイブリダイゼーションは寄生性であり、プローブの特異性を低下させる。好適プローブは、上記グループの配列のいずれかから形成される核酸フラグメントから構成され、該フラグメントは15～該当核酸配列の最大数のヌクレオチドを含む。

上記ヌクレオチド配列（及び以下に記載する他の配列）において、式の左端は常に該当配列の5'末端に対応し、右端は3'末端に対応する。

更に「グループXのプローブ」（XはNGI1, NGI2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4から選択される）と称するとき、このようなプローブは上記又は下記に定義するグループに属する核酸の1種に含まれる配列を有するものと理解されたい。

また、本明細書中で使用する「ヌクレオチド」なる用

語は、特に明記しない限りリボヌクレオチド及びデオキシヌクレオチド及び修飾ヌクレオチド（例えばイノシン）を無差別に意味するものと理解されたい。「ヌクレオチド」なる用語は更に、修飾基（例えばハイブリダイゼーション能に根本的に影響しない化学的修飾基）を含むヌクレオチドも包含する。このような修飾基の目的は、例えば特に該当RNA又はDNA鎖（例えば他のDNA及び／又はRNAと共に生物学的サンプル中に最初に含まれているRNA又はDNA鎖）とのハイブリダイゼーション産物から標識又はラベルされたプローブを後で検出するために適切なマーカー又はラベルと直接又は間接的に結合し易くすることである。

例えば、このような修飾基は、適切な酵素又は蛍光又は化学発光ラベルを担持する他の抗体により特異的に認識され得る抗体により認識可能である。可能な標識手順については追って詳細に説明する。

本発明は更に、上記配列のいずれかを有しており且つ上記プローブの特異性を変更しないように一部のヌクレオチドが置換したプローブにも係る。プローブは、上記グループのいずれかに属する核酸の1種又はその一部から構成される場合もあるが、その場合、プローブは*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*又は*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*株の遺伝材料に対する該プローブとの特異性を変えない程度までその両側にヌクレオチド延長部を含む。

従って本発明は、場合によりヌクレオチド配列に少数の些少の変異を有するほとんどの*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*もしくは*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*のRNA又はDNAに含まれる配列のヌクレオチド配列からなるレプリカ（数字の数にIC又はICRと記述することにより表す）、又は*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*もしくは*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*の天然RNA又はDNAに含まれる配列に相補的な配列（数字のみ又は数字の後にRを記述することにより表す）から形成されるプローブを提供する。

より詳細には、該当DNA中の標的配列は、このような標的に対する本発明のプローブのハイブリダイゼーション特異性に影響しないように、場合により株間に些少な天然の変異を有する*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilu*

s ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter

coli株の全部ではないとしても大部分に存在する以下の連続配列のいずれかから構成される。
Neisseria gonorrhoeaeの場合、

GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG

GTTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA。

Neisseria meningitidisの場合、

CAGGGCGACG TCACACTTGA CC

GACGTCACAC TTGACCAAGA AC

GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC

TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA

AATGGAACAGAATCCATTTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAGAACAAAA

GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA。

Branhamella catarrhalisの場合、

CTTTGGTAAG ATGTTTAA

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA。

Haemophilus ducreyiの場合、

Bordetella pertussisの場合、

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA。

AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG。

Haemophilus influenzaeの場合、

Streptococcus agalactiaeの場合、

AAGTGCGGTC AATTTGATGC GT

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT。

Streptococcus pneumoniaeの場合、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC。

AACAATTTGA ACCTTTCGAT T

AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC

TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA

AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA。

本発明のプロープは、対応するヌクレオチド配列を含むインサートを含む組換えプラスミドをクローニングし、必要に応じて適切なヌクレアーゼを使用してクローン化プラスミドから対応するヌクレアーゼ配列を切断し、例えば分子量に従う分画により回収することにより形成され得る。本発明のプロープは、例えば従来のホスホトリエステル法により化学的に合成することもできる。

本発明は更に、生物学的サンプル中で *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* 株を検出するための方法にも係り、該方法は、必要に応じて適切な変性条件下で核酸 (DNA 又は RNA) をハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プロープとサンプル中に存在し得る株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本発明のプロープと接触させる段階と、ハイブリッドが形成された場合にはこれを検出する段階とを含む。

本発明の方法は、該当生物を探索するサンプル中に存在する可能性のある酵母、真菌、原生動物、他の細菌株及び／又はヒト細胞から、*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* を、区別することができる。本発明の方法は、*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* 株をサンプル中で直接又は株を培養後に検出する方法に係る。

ハイブリッドが検出された場合、グループ NGI1, NGI2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3 及び SAI4 のプロープのいずれかの使用中に夫々 *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae* 及び

Streptococcus pneumoniae による感染が生物学的サンプル中に存在していたと判断することができる。

本発明の有利な実施態様によると、*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* 株を検出するための方法において、使用されるプロープは、生物学的サンプル中に存在し得る *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* 株の DNA 全体及び RNA とハイブリダイズするプロープである。

ハイブリダイゼーション条件は、例えばハイブリダイゼーション温度、媒体の成分の性質及び濃度、並びに形成されるハイブリッドの洗浄温度等の数個のパラメータに依存して監視され得る。

ハイブリダイゼーション及び洗浄温度はプロープ (その核酸組成、種類及び長さ) に応じて上限を制限され、本発明のプロープの最高ハイブリダイゼーション又は洗浄温度は約 30~58℃ である。温度がこれ以上になると、デュプレクシングはプロープと標的との間に形成されるハイブリッドの解離 (又は変性) に競合する。

好適ハイブリダイゼーション媒体は約 3 × SSC (1 × SSC = 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0)、約 25mM のリン酸緩衝液 pH7.1、20% 脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02% ウシ血清アルブミン、0.02% ポリビニルピロリドン及び約 0.1mg/ml の剪断変性サケ精子 DNA を含有する。

好適洗浄媒体は、約 3 × SSC、25mM リン酸緩衝液 pH7.1 及び 20% 脱イオンホルムアミドを含有する。他のハイブリダイゼーション又は洗浄媒体も使用できる。

しかしながら、プロープ又は媒体に変更を導入する場合、必要な特異性を得るためにプロープを使用可能な温度は、B. D. HAMES and S. J. HIGGINS, (eds.), *Nucleic acid hybridization. A practical approach*, IRL Press, Oxford, U. K., 1985 に記載されているような既知の関係に応じて変更すべきである。

この点では、一般にDNA:DNAハイブリッドはRNA:DNA又はRNA:RNAハイブリッドよりも安定性が低いことにも留意すべきである。従って、検出すべきハイブリッドの性質に依存して、特異的検出を実施できるようにハイブリダイゼーション条件を適応させるべきである。

本発明に従って、一般に*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*又は*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*株を検出するための方法は、ハイブリダイゼーションが特異的となるような値にハイブリダイゼーション温度を適宜調節することにより実施され得る。このような場合、より厳密な条件で洗浄する必要はない。

本発明の別の実施態様によると、ハイブリダイゼーション温度を必ずしもハイブリダイゼーションが特異的となるような値に調節する必要はなく、特に、ハイブリダイゼーションが特異的となるような値に対応する温度で洗浄を実施するのであるならば、ハイブリダイゼーションが特異的となるような温度よりも低い温度でハイブリダイゼーションを行ってもよい。

グループNGI1のプロープで*Neisseria gonorrhoeae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNGI2のプロープで*Neisseria gonorrhoeae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI1のプロープで*Neisseria meningitidis*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI2のプロープで*Neisseria meningitidis*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI3のプロープで*Neisseria meningitidis*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI4のプロープで*Neisseria meningitidis*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約48℃に調節すると適切であり、媒体は

上記に定義した類である。

グループNMI5のプロープで*Neisseria meningitidis*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約58℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI6のプロープで*Neisseria meningitidis*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBCI1のプロープで*Branhamella catarrhalis*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約30℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBCI2のプロープで*Branhamella catarrhalis*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約42℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBPI1のプロープで*Bordetella pertussis*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHDI1のプロープで*Haemophilus ducreyi*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHII1のプロープで*Haemophilus influenzae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHII2のプロープで*Haemophilus influenzae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI1のプロープで*Streptococcus agalactiae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI2のプロープで*Streptococcus agalactiae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は

は上記に定義した類である。

グループSAI3のプロープで*Streptococcus agalactiae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI4のプロープで*Streptococcus agalactiae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約37℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI1のプロープで*Streptococcus pneumoniae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI2のプロープで*Streptococcus pneumoniae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI3のプロープで*Streptococcus pneumoniae*株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

本発明は更に*Neisseria meningitidis*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、
－*Neisseria meningitidis*に特異的なプロープ、即ちグループNMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5又はNMI6のプロープと、
－これらのプロープと*Neisseria meningitidis*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
－前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Neisseria gonorrhoeae*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、
－*Neisseria gonorrhoeae*に特異的なプロープ、即ちグループNGI1又はNGI2のプロープと、
－これらのプロープと*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
－前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Branhamella catarrhalis*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、
－上記*Branhamella catarrhalis*に特異的なプロープか

ら選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループBCI1又はBCI2のプロープと、

－これらのプロープと*Branhamella catarrhalis*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

－前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Haemophilus ducreyi*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

－上記*Haemophilus ducreyi*に特異的なプロープから選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループHDI1のプロープと、

－これらのプロープと*Haemophilus ducreyi*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

－前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Bordetella pertussis*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

－上記*Bordetella pertussis*に特異的なプロープから選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループBPII1のプロープと、

－これらのプロープと*Bordetella pertussis*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

－前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Haemophilus influenzae*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

－上記*Haemophilus influenzae*に特異的なプロープから選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループHIII1又はHIII2のプロープと、

－これらのプロープと*Haemophilus influenzae*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

－前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Streptococcus agalactiae*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

－上記*Streptococcus agalactiae*に特異的なプロープから選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループSAI1, SAI2, SAI3又はSAI4のプロープと、

－これらのプロープと*Streptococcus agalactiae*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Streptococcus pneumoniae*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、
ー上記*Streptococcus pneumoniae*に特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループSPI1, SPI2又はSPI3のプローブと、
ーこれらのプローブと*Streptococcus pneumoniae*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、
ー上記*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*に特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブと、
ーこれらのプローブと*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を応じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のプローブは、核酸プローブを利用するアッセイの特異性を増加するサンドイッチハイブリダイゼーションシステムで使用することができる。核酸プローブに基づくアッセイにおけるサンドイッチハイブリダイゼーションの原理及び使用は更に記載されている（例えばDUNN and HASSEL, Cell, 12:23-36;1977;RANKI et al., Gene, 21:77-85;1983）。直接ハイブリダイゼーションアッセイは好ましい速度を有するが、サンドイッチハイブリダイゼーションは信号対雑音比が高いという点で有利である。更に、サンドイッチハイブリダイゼーションは核酸プローブに基づくアッセイの特異性を増加することができる。

適正に設計するならば、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは実際に、同一生物の2種の異なる核酸部分を認識する2種のプローブを使用する場合、核酸プローブに基づく試験の特異性を最大にすることができる。満足しなければならない唯一の要件は、2種のプローブの両方が（i）標的生物の同一核酸分子にハイブリダイズし、且つ（ii）同一の非標的生物にハイブリダイズしないことである。

2種の所与のプローブI及びIIを使用する場合、サンドイッチハイブリダイゼーションシステムは次のように説明することができる。

プローブIは生物（Cでなく）A及びB由来の核酸とハイブリダイズする。

プローブIIは生物（Bでなく）A及びC由来の核酸とハイブリダイズする。

両方のプローブが標的核酸にハイブリダイズすることが絶対的に必要であるので、生物A由来の核酸がサンプル中に存在する場合のみに検出可能なシグナルが発生される。プローブの一方が検出すべき生物に特異的である場合には、他方のプローブは第1のプローブよりも同一標的分子にハイブリダイズするのであれば、特異的配列から構成しても非特異的配列から構成してもよい。

本発明のプローブは、同一標的分子にハイブリダイズする別の非特異的又は特異的プローブと夫々組み合わせて*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*又は*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*に特異的なサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイで 사용할ことができる。サンドイッチハイブリダイゼーションプロセスでは、標的DNA及はRNAを探索する生物学的サンプルにプローブを同時に加えてもよいし、別々に加えてもよい。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Neisseria gonorrhoeae*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Neisseria gonorrhoeae*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Neisseria meningitidis*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Neisseria meningitidis*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Neisseria meningitidis*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Branhamella catarrhalis*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キッ

トは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Branhamella catarrhalis*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Branhamella catarrhalis*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Haemophilus ducreyi*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Haemophilus ducreyi*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Haemophilus ducreyi*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Haemophilus influenzae*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Haemophilus influenzae*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Haemophilus influenzae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Bordetella pertussis*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Bordetella pertussis*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Bordetella pertussis*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Streptococcus a*

*galactiae*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Streptococcus agalactiae*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Streptococcus agalactiae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Streptococcus pneumoniae*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Streptococcus pneumoniae*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Streptococcus pneumoniae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Campylobacter jejuni*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Campylobacter jejuni*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Campylobacter jejuni*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で*Campylobacter coli*株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が*Campylobacter coli*に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと*Campylobacter coli*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のプロープは、コンペティションハイブリダイゼーションプロトコルでも使用することができる。

コンペティションハイブリダイゼーションでは、標的分子は特異的プロープとその補体との間に形成されるハイブリッドに競合する。標的数が多ければ多いほどプロープとその補体との間に形成されるハイブリッドの量は少なくなる。特異的標的が存在していたことを示す陽性シグナルは、標的を加えなかったシステムと比較してハイブリダイゼーション反応が低いことにより確認される。特定の実施態様によると、適切に標識した特異的オリゴヌクレオチドプロープを標的分子とハイブリダイズさせる。次に、混合物を受容器（例えばマイクロタイター皿のウェル）に移し、特異的プロープに相補的なオリゴヌクレオチドを固定し、ハイブリダイゼーションを続ける。洗浄後、相補的オリゴヌクレオチドとプロープとの間に形成されたハイブリッドを、使用したラベルに応じて好ましくは定量的に測定する。

本発明のオリゴヌクレオチドは、酵素的に増幅した特異的フラグメントを生成するためにポリメラーゼ鎖反応技術（PCR; Mullis and Faloona, Methods in Enzymology 155:335-350, 1987）で増幅プライマーとして及び／又は夾叉オリゴヌクレオチドプライマー間で増幅されたフラグメントを検出するためのプロープとして使用することができる。

PCRによるハイブリダイゼーションアッセイの特異性は種々のレベルに調節することができる。

増幅法又は検出法又はその両方は特異的であり得る。両方が特異的な場合は特異性が最大になるので好適である。このようなPCRを利用する高特異性試験は本発明のプロープを使用して実施され得る。

しかしながら、場合によっては、多様な生物に使用できるように増幅法を標準化するために、特異的検出に結び付けられた本発明の検出プロープを夾叉する保存性プライマーを使用する非特異的増幅法が有利である。

標準化増幅法で使用される増幅プライマーは、スペーサー領域の両側の16S及び23SrRNA遺伝子の保存領域に見いだされる（実施例1参照）。

本発明は更に、検出すべき微生物に特異的な本発明のプロープのいずれかを使用して生物学的サンプルに含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro 検出するための方法にも係り、該方法によると、好ましくはプロープ領域を夾叉する少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する（標的配列を含む）DNA及び／又はRNAを標識し、増幅した標的配列と膜上のプロープとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプロープを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出する。

増幅が必要な場合、その目的は標的配列を増幅し（それによって標的配列の夾叉領域も増幅させ）、増幅領域のみを標識することである。

生物学的サンプル中に十分な標的配列が存在する場合、増幅は不要である。

このような場合、ハイブリダイゼーション前に例えば化学的手段により又は特異的染料の添加により標識を実施すべきであり、生物学的サンプル中に存在するDNA及び／又はRNA全体を標識することに留意すべきである。

本発明は更に、生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro 検出するためのキットに係り、該キットは、
—検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした本発明のプロープの少なくとも1種と、
—該プロープの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
—酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプロープと検出すべき微生物のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

上記方法及びキットは、Saiki et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6230-6234, 1989) により記載されている逆ドットプロットアッセイのような逆ハイブリダイゼーションドットプロットアッセイを含む。

この場合、5' ビオチニル化プライマーを用いるPCRを使用して標的配列をまず酵素的に増幅する。第2段階では、固体支持体に固定した特異的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション後、増幅産物を検出する。この方法は実施例2に記載する変形方法のような数種の変形が考えられる。例えば、この方法はスペーサー領域を夾叉する普遍的プライマーを用いるPCR、及び該当生物の種々の特異的オリゴヌクレオチドプライマーをドットスポットした膜とのハイブリダイゼーション後に特定の臨床サンプル中に存在し得る種々の微生物の同時且つ特異的検出に特に有利であり得る。上記のような逆ハイブリダイゼーションアッセイで使用可能な特異的オリゴヌクレオチドプライマーの有利なパネルの例を以下に挙げる。

- (i) 痰パネル: Moraxella (Branhamella) catarrhalis
Streptococcus pneumoniae
Haemophilus influenzae
- (ii) CSF-パネル: Neisseria meningitidis
Haemophilus influenzae
Streptococcus pneumoniae
- (iii) 尿生殖-パネル: Neisseria gonorrhoeae
Haemophilus ducreyi
Chlamydia trachomatis

Treponema pallidum

当然のことながら、これらのパネルは他の臨床的に関連する微生物のプロープを加えることにより拡張することができる。歯周ポケットからのサンプル又は血液サンプルのような他の臨床サンプルのパネルも利用できる。

PCRには、非普遍的に保存されたプライマー、例えばスペーサー領域自体に配置されたプライマーも使用することができ、PCRは1組のプライマーを用いて又は同一反応容器で種々の組のプライマーを用いて実施することができる。

増幅段階なしに逆ハイブリダイゼーションを実施することもできる。この場合、サンプル中に存在する核酸をハイブリダイゼーション前に例えば化学的手段又は特異的染料の添加により特異的又は非特異的に標識又は修飾すべきである。

ほとんどの場合、スペーサー領域から誘導され得る該当生物の特異的プロープの数は、本明細書に記載するプロープに制限されない。

生物によっては、種々の細菌の高特異性且つ高感度のプロープの開発のためにスペーサー領域を利用できることが立証されているプロープは1又は2種しか記載されていない。Bordetella pertussisのみが例外であり、スペーサー領域の唯一の特定領域 (Bordetella pertussis配列中のヌクレオチド271~299、図2の上段) が特異的配列を有する。しかしながら、Bordetella pertussisのスペーサー領域配列から、高度に関連するBordetella種の同時検出に有用であり得るプロープを設計することができる。Bordetella pertussis以外のBordetella種を検出するプロープも図2の配列から推定することができる。同様に、Moraxella nonliquefaciens及びHaemophilus influenzaeバイオグループaegyptiusの潜在的に特異的なプロープも夫々図7及び8に示すスペーサー配列から推定することができる。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のNeisseria gonorrhoeae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、
—固体支持体に固定されたNeisseria gonorrhoeaeに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、
—該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
—酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとNeisseria gonorrhoeae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のNeisseria meningitidis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

—固体支持体に固定されたNeisseria meningitidisに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

—該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
—酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとNeisseria meningitidis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のHaemophilus ducreyi株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

—固体支持体に固定されたHaemophilus ducreyiに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、
—該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
—酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のBranhamella catarrhalis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

—固体支持体に固定されたBranhamella catarrhalisに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、
—該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
—酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとBranhamella catarrhalis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のBordetella pertussis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

—固体支持体に固定されたBordetella pertussisに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、
—該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
—酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとBordetella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩

衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のHaemophilus influenzae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

—固体支持体に固定されたHaemophilus influenzaeに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

—該プロープの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

—酵素的増幅が可能であり及び／又は前記プロープとHaemophilus influenzae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のStreptococcus pneumoniae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

—固体支持体に固定されたStreptococcus pneumoniaeに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

—該プロープの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

—酵素的増幅が可能であり及び／又は前記プロープとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のStreptococcus agalactiae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

—固体支持体に固定されたStreptococcus agalactiaeに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

—該プロープの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

—酵素的増幅が可能であり及び／又は前記プロープとStreptococcus agalactiae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

—固体支持体に固定されたCampylobacter jejuniに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少な

くとも1種のプロープと及びCampylobacter coliに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

—該プロープの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

—酵素的増幅が可能であり及び／又は前記プロープとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

プロープの使用条件

本発明のプロープは標識すると有利である。任意の従来のラベルを使用することができる。プロープは、³²P、³⁵S、¹²⁵I、³H及び¹⁴Cのような放射性トレーサーにより標識され得る。

放射性標識は、(標識すべき末端に応じて)放射性標識ヌクレオチド、(ホスファターゼによる脱リン酸化を伴うか又は伴わない)ポリヌクレオチドキナーゼ、末端転移酵素又はリガーゼを使用することにより、3'又は5'位の末端標識のような任意の従来方法に従って実施され得る。本発明のプロープの1種は、数種の放射性ヌクレオチド又は数種の放射性及び非放射性ヌクレオチドから構成される鎖の合成用マトリックスであり得る。

本発明のプロープは、1又は数種の放射性ヌクレオチドを使用する化学的合成により製造することもできる。別の放射性標識方法は本発明のプロープの化学的ヨウ素化であり、プロープに数個の¹²⁵I原子を結合させる。

本発明のプロープの1種が非放射性RNA又はDNAとのハイブリダイゼーションに使用するように放射性標識される場合、ハイブリダイゼーションの検出方法は、使用される放射性トレーサーに依存する。一般に、放射性トレーサーにより発生される電離性放射線を検出することが可能なオートラジオグラフィ、液体シンチレーション、γ計数又は他の任意の従来方法を使用することができる。

免疫特性(例えば抗原又はハプテン)、ある種の試薬に対する特異的親和性(例えばリガンド)、検出可能な酵素反応を提供する特性(例えば酵素、補酵素、酵素基質又は酵素反応に関与する基質)、又は物理的特性(例えば任意の波長の光の蛍光、発光又は吸収)を有する残基に本発明のプロープを組み合わせるにより非放射性標識を使用することもできる。プロープと標的により形成されるハイブリッドを特異的に検出する抗体も使用できる。

本発明のプロープを化学的に合成する場合には非放射性ラベルを使用することができ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジン及びウラシル残基は、プロープ又はプロープと相補的DNAもしくはRNAフラグメントとの

間に形成されたハイブリッドを検出することが可能な他の化学的残基に結合し得る。

一方、1種以上のヌクレオチドを他の化学的残基に結合することにより修飾した場合、プローブのヌクレオチド配列は本発明のプローブの1種のヌクレオチド配列と同一である。

本発明は更に、上記のように標識され且つ検出可能な本発明のプローブを使用してハイブリダイゼーションによりRNA及び／又はDNAを検出するための方法にも係る。この点では、従来のハイブリダイゼーション方法を使用することができる。

生存生物起源の細胞又はそれ自体生存生物である細胞を検出するためには、化学的又は物理的方法を使用して細胞の部分的又は全溶解によりこれらの細胞のRNA及び／又はDNAに必要に応じてアクセスできるようにし、検出可能な本発明の1又は数種のプローブと接触させる。この接触は、液体媒体又は溶液中でニトロセルロース、セルロース又はナイロンフィルターのような適当な支持体上で実施され得る。この接触は、次善、最適又は制限条件（即ち配列が所定の分子長で完全に相同である場合のみにハイブリッド形成可能な条件）下で実施され得る。このような条件は、温度、反応物質濃度、最適核酸対合温度を低下させる物質の存在（例えばホルムアミド、ジメチルスルホキシド及び尿素）、及び反応容量を外見上低下させるか及び／又はハイブリッド形成を促進する物質の存在（例えばデキストラン硫酸、ポリエチレングリコール又はフェノール）を含む。

ハイブリダイズしなかった本発明のプローブを除去するには、適切なイオン力価及び適切な温度の緩衝溶液で洗浄し、場合により、S1ヌルレアーゼ又は一本鎖DNAもしくはRNAを消化するが、DNA-RNAハイブリッドもしくは二本鎖DNAを消化しない他の任意の酵素で処理する。

液体媒体中で、細胞DNA又はRANフラグメントに対合した本発明のプローブのハイブリッドは種々の方法、例えばヒドロキシアパタイト上のクロマトグラフィーにより液体媒体の残余から分離することもできる。

次に、ハイブリダイズしたプローブをプローブ上のラベルにより検出する。

染色体DNAフラグメントを標的にするためには、RNAを1又は数種の酵素で処理し、DNAフラグメントを変性（即ち両鎖を分離）した後、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本発明のプローブの1種をDNAフラグメントと接触させ、ハイブリダイゼーションの終了に達するために必要な時間後、ハイブリダイズしなかったフラグメントをハイブリダイズしたフラグメントから分離し、細胞検出について上述したようにラベルを検出する。

一般に、異種DNAの存在が該当用途でプローブの特異性を損なわないならば、クローニングを可能にする組換えDNA中に本発明の種々のプローブを含むこともできる。

図1～図10には、種々の微生物中で発見されたスペーサー領域のアライメント（全部または一部を配列したもの）が例として示されている。対（match）及び空所（gap）は各々、“:”及び“-”で表されている。総ての配列に関して、非コードストランドは、その5′-3′配列で示されている。

5′末端は、16S rRNA遺伝子の近位であり、3′末端は、23S rRNA遺伝子の近位である。

図1～図10に参照される各生体（E. coliの1種を除く）の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の各核酸配列は、新規であることは指摘されねばならない。

図1には、Neisseria gonorrhoeae組NCTC 8375（上列）及びITM 4367（下列）の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の16S rRNA近位端の核酸配列アライメントが示されている。

図2には、Bordetella pertussis ATCC 10380（上列）及びBordetella bronchiseptica NCTC 452（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図3には、Neisseria meningitidis NCTC 10025（上列）及びNeisseria gonorrhoeae NCTC 8375（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図4には、Neisseria gonorrhoeae NCTC 8375（上列）及びBordetella pertussis ATCC 10380（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図5には、Branhamella catarrhalis ITM 4197（上列）及びNeisseria gonorrhoeae NCTC 8375（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図6には、Haemophilus ducreyi CIP 542（上列）及びEscherichia coli（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図7には、Branhamella catarrhalis ITM 4197（上列）及びMoraxella nonliquefaciens ATCC 19975（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図8には、Haemophilus influenzae（パイオグループinfluenzae）NCTC 8143（上列）及びHaemophilus influenzae（パイオグループaegyptius）ITM 859（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図9には、Streptococcus pneumoniae S90-5122（上列）及びStreptococcus agalactiae U90-2817（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図10には、Campylobacter jejuni ATCC 33560（上

列) 及び *Campylobacter coli* ATCC 33559 (下列) の16S と23S rRNA との間のスペーサー領域の23S rRNA近位端の核酸配列アライメントが示されている。

使用した株は、各々培地コレクション:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA.

CIP: Collection de l' Institut Pasteur, Paris, France.

ITM: Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

NCTC: National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, United Kingdom.

から入手し得る。

以下の実施例は、本発明のプロープの製造法及び種々のハイブリダイゼーションプロトコルを使用するプロープの特異性及び感度に関する実験結果に関する。臨床に適当な以下の生体: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae* 及び *Bordetella pertussis* を選択した。

実施例は、種一特異性で感度の高いプロープが、研究した総ての生体のスペーサー領域に容易に知見されたことを示している。さらに、種一特異性で感度の高いプロープが16S及びまたは23S rRNA分子に知見されない生体のこの領域からプロープが構築され得ることを示している。使用した方法は、他に記載しない限り、ROSSAUらの *J. Gen. Microbiol.*; 135:1735-1745, 1989 または欧州特許出願第8940/045.3に記載の方法と本質的に同一である。rRNA遺伝子フラグメントの酵素的増幅法及び逆ハイブリダイゼーションを除く総ての方法は現在当業者に公知である。16S-23S rRNAスペーサー領域を広げるrRNA遺伝子フラグメントの酵素的増幅法は、Perkin Elmer Cetusの“Gene Amp”キットに推薦される方法に従って実施したポリメラーゼ鎖反応法 (PCR) により得られた。rRNA分子中に保存されたまたは半分保存された (semi-cons

erved) 領域に対応するヌクレオチドをPCRプライマーとして使用した。逆ドットプロット法の原理及びプロトコルは、Saikiら (1989) により記載されている。

実施例1

Neisseria meningitidis 及び *Neisseria gonorrhoeae* の両方は、各々髄膜炎及び淋疾に関連する重要なヒト病原体である。これらの生体は非常に密接に関連しており、互い及び他の *Neisseria* 種との差別化は間違い易い。*Neisseria meningitidis* 及び *Neisseria gonorrhoeae* に特異的なDNAプロープは、両方の *Neisseria* 種の間の正しい差別化を速め且つ臨床サンプル中でこれらの種を直接検出するために使用し得る。

Neisseria gonorrhoeae を検出するために多くのDNAプロープについて記載されてきた (欧州特許出願第0272 009号及び同第0337 896号; URDEAら, *Clin. Chem.* 35:1571-1575, 1989; TOTTEENら, *J. Infect. Dis.* 148:462-471, 1989; DONEGANら, *Mol. Cell. Probes* 3:13-26, 1989; KOLBERGら, *Mol. Cell. Probes* 3:59-72, 1989)。しかしながら、これらのプロープの内の幾つかは、非-*Neisseria gonorrhoeae* 株と交差するか、感度が低いことが知見された。これらのプロープは総て16S-23S rRNAスペーサー領域由来ではなかった。

Neisseria meningitidis 株を検出するDNAプロープも報告された (KOLBERGら, *Mol. Cell. Probes* 3:59-72, 1989)。 *Neisseria gonorrhoeae* のピリン遺伝子から誘導されたこのプロープも、*Neisseria meningitidis* に関して非常に特異性でもなく感度も高くないことが知見された。

Neisseria gonorrhoeae 及び *Neisseria meningitidis* 型株の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列を、スペーサー領域を広げるPCRフラグメント由来のクローン化した物質を使用して決定した。図3に示されている両方の列から、幾つかの潜在的なプロープ配列が明らかになった。

約60塩基対の予想外の挿入配列を、*Neisseria meningitidis* 株のスペーサー領域中に検出した。以下の配列:

GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG NMI 1

GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC NMI 2

を有するオリゴヌクレオチドを、この挿入した配列から誘導した。

(図3の *Neisseria meningitidis* 配列の塩基対365~386由来の) スペーサー領域のもう1つのエリアでも、*Neisseria meningitidis* と *Neisseria gonorrhoeae* との間で

かなりの度合いで食い違いが明らかになった。このエリアから、2種類のオリゴヌクレオチドプロープ (*Neisseria meningitidis* 及び *Neisseria gonorrhoeae* の検出用のNMI3及びNGI1):

GCGTTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC NMI 3

CGATGCGTCC TTATTCTACT TCGC NGI 1

が化学的に合成された。

これらのヌクレオチドを、ポリヌクレオチドキナーゼ

を使用してその5'末端を³²Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してその3'末端で

ジゴキシゲニル化したUTPと結合して、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、種々の位置由来の多くの*Neisseria meningitidis*及び*Neisseria gonorrhoeae*株由来のドットスポットした変性ゲノムDNA及び他の細菌 (bacterial taxa) 由来の幾つかの株を使用した。

ハイブリダイゼーション混合物は、3 × SSC、25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド (20%, v/v)、Ficoll (0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン (0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン (0.02%, w/v) 及びシェアをかけて変性したサケ精液DNA (0.1mg/ml) であるか、または5 × SSCの代わりに3 × SSC (1 × SSC:0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0) を使

用し且つホルムアミドを20% (v/v) まで添加した以外には、非-放射性DNAラベル及び検出キット (Boehringer Mannheim製) のプロトコルシートの溶液であった。洗浄液は、3 × SSC、20%ホルムアミド及び25mMリン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。

ハイブリダイゼーションの結果は、以下の表にまとめられている。各プローブ毎のハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、括弧内に示されている。試験した総てのプローブは、*Neisseria gonorrhoeae* (プローブNGI1) または*Neisseria meningitidis* (プローブNMI1, NMI2及びNMI3) に対し非常に特異性で且つ感度が高かったことが証明された。

分 類	陽 性 株 数 / 試 験 株 数			
	NMI1	NMI2	NMI3	NGI1
	(45°C)	(45°C)	(40°C)	(50°C)
<u>Neisseria meningitidis</u>	52/53	10/11	56/56	0/11
<u>Neisseria</u> sp ATCC 43831	1/1	1/1	1/1	0/1
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	0/16	0/9	0/10	10/10
<u>Neisseria polysaccharea</u>	0/3	-	0/3	0/3
<u>Neisseria lactamica</u>	0/10	-	0/10	0/10
<u>Neisseria cinerea</u>	0/4	-	0/4	2/4
<u>Neisseria mucosa</u>	0/3	-	0/3	0/3
<u>Neisseria macacae</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria flavescens</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria subflava</u>	0/2	-	0/2	0/2
<u>Neisseria sicca</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria elongata</u>	0/2	-	0/2	0/2
<u>Neisseria canis</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria animalis</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria denitrificans</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria</u> sp	0/5	-	0/4	0/3
CDC group M-5	0/1	-	0/1	0/1
CDC group EF-4a	0/1	-	0/1	0/1
<u>Kingella denitrificans</u>	0/2	-	0/1	0/1
<u>Kingella kingae</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Simonsiella muelleri</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Simonsiella crassa</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Simonsiella steedae</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Simonsiella</u> sp	0/1	-	0/1	0/1
<u>Alviella filiformis</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Eikenella corrodens</u>	0/2	-	0/2	0/2
<u>Chromobacterium violaceum</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Iodobacter fluviatile</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Aquaspirillum dispar</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Comamonas testosteroni</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Haemophilus influenzae</u>	0/1	-	-	-
<u>Haemophilus ducreyi</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Kingella indologenes</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Moraxella lacunata</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella nonliquefaciens</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella catarrhalis</u>	0/3	-	0/2	0/2
<u>Moraxella cuniculi</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella caviae</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella ovis</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella osloensis</u>	0/1	-	-	-
<u>Escherichia coli</u>	0/1	0/1	0/1	0/1

NMI3及UNGI3で検出する特異性を、16S rRNA遺伝子の 3' 末端及び23S rRNA遺伝子の5' 末端に各々配置して いる以下の増幅プライマー:

TGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

AP16

CAC GTC CTTCGTCGCCCT

とのスペーサー領域の酵素的増幅後においてもチェックした。Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Haemophilus ducreyi、Bordetella pertussis及びBrachyella catarrhalisの株由来のゲノムDNAの100ナノグラムをPCR反応に使用した。増幅後、収量の1/10をアガロースゲルに装填し、電気泳動させ、ナイロン膜上にプロットした。

続いてこの膜をプローブNGI1及びNMI3でハイブリダイズした。

各々NGI1またはNMI3をプローブとして使用したとき、Neisseria gonorrhoeaeまたはNeisseria meningitidis物質が存在するレーンだけにはっきりしたハイブリダイゼーションシグナルが検出できた。

実施例2

Bordetella pertussisは、百日咳の原因となる因子である。再度の予防接種キャンペーンにより、この病気は先進国では殆ど問題ではない。しかしながら第3世界の国々に於いては、Bordetella pertussisは、幼児の致死率のトップである。

3種類のBordetella種 (Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica) の株は非常に関連しているので (KL00Sら, Int. J. Syst. Bacteriol. 31:173-176, 1981; DE LEYら, Int. J. Syst. Bacteriol. 36:405-414:1986)、ひとつの遺伝子種に属するものとして考えるべきである。この遺伝子型の関係は、これらの細菌の他の多くの特徴にも反映するので、その表現型の差別化が冗長となる。

百日咳の臨床兆候はたいがい非定型であり、検査室診断が必要である。感度が高く、特異的で迅速な試験はまだ無い。培地には選択方法が残っているが、回収率は低き且つ結果は通常、接種後3〜7日しか有効でない (FR IEDMAN, Clin. Microbiol. Rev. 4:365-376, 1988; HALPERIN

AP23

ら, J. Clin. Microbiol. 27:752-757, 1989)。DNAプローブベースの分析は、Bordetella pertussis感染の診断を非常に改良し得る。

Bordetella pertussisの検出用プローブは、文献 (PARKら, FEMS Microbiol. Lett. 52:19-24, 1988; McPHEAT及びMcNALLY, J. Gen. Microbiol. 133:323-330, 1987及びFEMS Microbiol. Lett. 41:357-360, 1987; McLAFFERTYら, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology C-168, 1986及びC-322, 1987) に記載されている。McLAFFERTYら (1986及び1987) に記載のプローブは、特異性が高くない。記載の他のプローブに関しては、示されたデータは特異性及び感度の度合いを推論するには不十分である。

以下の株のリボソームRNA遺伝子の一部を酵素的に増幅し、プラスミドベクター:Bordetella pertussis ATCC 10380, Bordetella parapertussis NCTC 5952 (型株) 及びBordetella bronchiseptica NCTC 452 (型株) にクローン化した。種々の種類のクローン化したフラグメントを、ジデオキシ鎖停止法を使用して一部配列し、その配列を比較した。16S rRNA遺伝子に拘わる配列情報は、種-特異性プローブが与えられないことを示している (ROSSAUら, 未発表)。しかしながら図2のアライメントに示されたように、相同でないエリア (271塩基対〜約300) がBordetella pertussis及びBordetella bronchiseptica株の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域に知見された。

Bordetella parapertussis株のスペーサー領域の配列は、Bordetella bronchiseptica配列と大体同一である (ROSSAUら, 未発表)。

Bordetella pertussisのスペーサー領域のヌクレオチド271と295との間のエリアから、以下の配列:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GCCTT BPI1

を有するオリゴヌクレオチドプローブを誘導した。

オリゴヌクレオチドプローブを化学合成し、ターミナルトランスフェラーゼを使用してジデオキシジニール-UTP

でラベルした。ターゲットとしてドットスポットし、変性したゲノムDNAで得られた結果を以下の表にまとめた。

分類

55℃に於けるBPI 1とのハイブリダイゼーション

陽性株数/試験株数

<u>Bordetella pertussis</u>	4/4
<u>Bordetella parapertussis</u>	0/3
<u>Bordetella bronchiseptica</u>	0/3
<u>Alcaligenes denitrificans</u>	0/1
<u>Alcaligenes paradoxus</u>	0/1
<u>Oligella ureolytica</u>	0/1
<u>Oligella urethralis</u>	0/1
<u>Taylorella equigenitalis</u>	0/1
<u>Pseudomonas cepacia</u>	0/1
<u>Pseudomonas solanacearum</u>	0/1
<u>Comamonas testosteroni</u>	0/1
<u>Neisseria meningitidis</u>	0/1
<u>Branhamella catarrhalis</u>	0/1
<u>Haemophilus influenzae</u>	0/1

使用条件下に於いて、プローブBPI1はBordetella pertussisに対し100%特異性で且つ100%の感度であることを証明した。

ハイブリダイゼーション混合物は、5×SSCの代わりに3×SSC (1×SSC:0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0) を使用し、ホルムアミドを20% (v/v) まで添加したことを除いて、非-放射性DNAラベル及び検出キット (Boehringer Mannheim製) のプロトコルシートに記載のものと同じであって、洗浄液は3×SSC、20%ホルムアミド及び25mMリン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は55℃であった。

逆ドット-プロット分析を利用すると、上記表に示されているのと本質的に同一結果が得られた。この分析は以下のように実施した：

異なる細菌種から得られた種々の株からの殺菌DNAIngを、ジオキシゲニン-11-dUTP (Boehringer Mannheim) を増幅混合物に添加して最終濃度40 μMとした以外には、GeneAmpキット (Perkin Elmer Cetus) の製造業者により推奨されるように酵素的に増幅した。プライマーAP16及びAP23 (実施例1参照) を用いて全部で50 μlで30サイクル (1分/95℃, 1分/50℃, 1分/72℃) 実施し、その後各PCR混合物の5 μlを膜の存在下にハイブリダイゼーション混合物 (上記定義通りの組成物) 1mlに添加し、これにプローブBPI1の0.2pmol、0.02pmol及び0.002pmolを固定した。ハイブリダイゼーションを55℃で1時間実施した。洗浄工程を同一温度で10分間実施した。非-放射性DNAラベル及び検出キット (Boehringer Mannheim製) に記載の如く検出した。ゲル電気泳動及び逆ドット-プロットプロトコルを使用する臭化エチジウム染色後に実験した全サンプル中にはっきりしたバン

ドを検出したが、もっぱらBordetella pertussis DNAが存在するサンプルにはっきりした陽性シグナルが得られた。

実施例3

Moraxella catarrhalisまたはNeisseria catarrhalisとも知られるBranhamella catarrhalisは、特殊培養基を必要とする生化学的に不活性な細菌である。近年、その重要な病原体としての潜在能力が認識された。

Branhamella catarrhalisは、重い気道感染症によく含まれる (HAGERら, Rev. Infect. Dis. 9:1140-1149, 1987)。Branhamella catarrhalisの診断には、特殊培養基を必要としない微生物による異常増殖により阻止されるこの生体の培地と、この生体と口腔内に存在する共動生物 (例えば、Neisseria種など) とを区別するための一組の表現型試験器具とが必要である。

時々、表現型が類似の細菌由来のBranhamella catarrhalisを差別化する試験が限られているので、表現型試験は、推定上のBranhamella catarrhalis単離物の識別に関しては決定的ではない (RIOU及びGUIBOURDENCHE, Drugs 31 [補遺, 3] :1-6, 1986)。分析に基づいてDNAプローブを使用すると、Branhamella catarrhalisの検査室診断をかなり簡素化できる。未特定DNAフラグメントから誘導し、Neisseria caviae由来のDNAで交差ハイブリダイズしたBranhamella catarrhalis用とDNAプローブについては、BEAULIEU及びROYにより記載されている (Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Abstract No. D-249, 1989)。

Branhamella catarrhalis ITG 4197のrRNA遺伝子の一部を、ポリメラーゼ鎖反応法により酵素的に増幅させ、プラスミドベクターにクローン化した。続いて16S-23S rRNAスペーサー領域を広げるフラグメントをジデオキ

鎖停止法により配列した。この配列は図7に示されている（上列）。配列データより、以下のオリゴヌクレオ

チド：

TTAAACATCT TACCAAAG

を選択し、化学的に合成した。

このオリゴヌクレオチドをその5'末端でポリヌクレオチドキナーゼで²³Pラベルし、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、異なる位置の31 *Branhamella catarrhalis*株及び他の細菌分類の19株のドットスポットした。変性ゲノムDNAを使用した。

ハイブリダイゼーション混合物は、3×SSC（1×SSC:0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0）、25mMリン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド（20%, v/v）、Ficoll（0.02%, w/v）、ウシ血清アルブミン（0.02%, w/v）、ポリビニルピロリドン（0.02%, w/v）及びシアアを掛けて変性したサケ精液DNA（0.1 mg ml⁻¹）であった。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mMリン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、30℃であった。

使用条件下で、プローブBCI1を総ての*Branhamella catarrhalis*株にハイブリダイズした。他の細菌種の属する試験した株は総て、このプローブに対し強いハイブリダイゼーションシグナルを与えなかった。

試験した非-*Branhamella catarrhalis*株は：

<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17967
<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17952
<i>Moraxella bovis</i>	ITM 1601
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	ATCC 19975
<i>Neisseria cuniculi</i>	ITM 3388
<i>Neisseria ovis</i>	NCTC 11227
<i>Neisseria caviae</i>	ATCC 14659
<i>Alysiella</i> sp.	ATCC 29468

TTATTATGCC CGAGGCATAT TG

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5'末端で³²Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してジデオキシ化UTPでその3'末端を結合し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。

ターゲットとして、種々の位置からの41 *Haemophilus ducreyi*株及び他のバクテリア分類の幾つかの株の、ドットスポットした変性したゲノムDNAを使用した。総ての*Haemophilus ducreyi*株にもつぱらハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを試験した。

ハイブリダイゼーション混合物は、5×SSCの代わりに3×SSC（1×SSC:0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0）を使用し、ホルムアミドを20%（v/v）まで添加したことを除いて、3×SSC、25mMリン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド（20%, v/

BCI 1

<i>Moraxella osloensis</i>	LMG 1043
<i>Moraxella osloensis</i>	ATCC 17974
“ <i>Moraxella paraphenylpyruvica</i> ”	LMG 5125
“ <i>Moraxella camembertii</i> ”	LMG 7022
<i>Psychrobacter immobilis</i>	LMG 6784
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23005
<i>Escherichia coli</i>	B
<i>Haemophilus influenzae</i>	NCTC 8143
<i>Eikenella corrodens</i>	NCTC 10596
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	LMG 958
<i>Xanthomonas campestris</i>	LMG 568

であった。

実施例4

軟性下疳の原因となる*Haemophilus ducreyi*は、特殊培養基を必要とするグラム陰性細菌である。この生体の培地は、困難で且つ感度が無いが、依然として、*Haemophilus ducreyi*感染の診断のための選択方法である。特異性の高いプローブを使用すると、培地が不要で且つ診断の感度が強くなる。他の*Haemophilus*及び*Pasteurella*種と弱い交差反応性を示し、蛋白質をコードする遺伝子をターゲットとする*Haemophilus ducreyi*用のクローン化したDNAプローブは、PARSONSらにより記載されている（J. Clin. Microbiol. 27:1441-1445, 1989）。

Haemophilus ducreyi CIP 542型株のrRNA遺伝子の一部をポリメラーゼ鎖反応により酵素的に増幅し、プラスミドベクターにクローン化した。

16Sと23S rRNA遺伝子との間のスパーサー領域の配列は、ジデオキシ鎖停止法により得られた。核酸配列より、以下のオリゴヌクレオチド：

HDI 1

v）、Ficoll（0.02%, w/v）、ウシ血清アルブミン（0.02%, w/v）、ポリビニルピロリドン（0.02%, w/v）及びシアアを掛けて変性したサケ精液DNA（0.1 mg ml⁻¹）または、非-放射性DNAラベル及び検出キット（Boehringer Mannheim製）のプロトコルシートの溶液であった。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mMリン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、40℃であった。

試験した非-*Haemophilus ducreyi*株は：

<i>Escherichia coli</i> MC 1061
<i>Escherichia coli</i> B
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> NCTC 9710
<i>Actinobacillus lignieresii</i> NCTC 4189
<i>Haemophilus aphrophilus</i> NCTC 5906
<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8143

Histophilus ovis HIM 896-7
 Pasteurella multocida NCTC 10322
 Branhamella catarrhalis ITM 4197
 Comamonas testosteroni ATCC 17407
 Oligella urethralis LMG 6227
 Neisseria gonorrhoeae ITM 4437
 Campylobacter jejuni CCUG 11284
 Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055
 未識別株 ITM 3565

であった。

実施例 5

グラム陰性細菌種 *Haemophilus influenzae* は、2 種類のバイオグループ: *influenzae* 及び *aegyptius* に分類することができる (Casin ら, Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 137B:155-163, 1986)。 *influenzae* バイオグループの生体は、重要な呼吸器道の病原体であり、子供の脳膜炎及び耳炎の原因でもある。バイオグループ *aegyptius* 単離

物は、暑い気候では、細菌性結膜炎の原因として作用する因子であり、ブラジル紫斑熱と関連しているらしい (Brenner ら, J. Clin. Microbiol. 26:1524-1534, 1988)。分類可能な及び非分類可能な *Haemophilus influenzae* は、核酸プローブにより迅速に検出され得る。

この種の DNA プローブは、文献に記載されている (Terpstra ら, Scand. J. Infect. Dis. 19:641-646, 1987; Malouin ら, J. Clin. Microbiol. 26:2132-2138, 1988)。これらのプローブは 16S-23S rRNA プレーサー領域から誘導されているものではない。

Haemophilus influenzae NCTC 8143 型株の rRNA 遺伝式の一部を、ポリメラーゼ鎖反応により酵素的に増幅させ、次いでプラスミドベクターにクローン化した。

16S と 23S rRNA 遺伝子との間のプレーサー領域の配列がジデオキシ鎖停止方法により得られた。核酸配列から、以下のオリゴヌクレオチド:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT HII 1

ACTTTGAAGT GAAAACTTAA AG HII 2

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその 5' 末端で ³²P ラベルし、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、細菌の分類単位のドットスポットした、変性したゲノム DNA を使用した。

両方のプローブを使用したハイブリダイゼーション結果を以下の表にまとめた。使用したハイブリダイゼーション及び洗浄温度では、プローブ HII1 は *Haemophilus influenzae* バイオグループ *aegyptius* 株にハイブリダイズしなかった。プローブ HII2 は、両方のバイオグループの株にハイブリダイズした。両方のプローブは、表示温度

で、Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium から得た他の 15 種類の *Haemophilus influenzae* バイオグループ *influenzae* の臨床単離物にもハイブリダイズした。

ハイブリダイゼーション混合物は、3 × SSC、25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド (20%, v/v)、Ficoll (0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン (0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン (0.02%, w/v) 及びシエアをかけて変性したサケ精液 DNA (0.1mg ml⁻¹) であった。洗浄液は、3 × SSC、20%ホルムアミド及び 25mM リン酸塩緩衝液 pH7.1 を含んでいた。

分類単位	プローブ	
	HI11(50℃)	HI12(30℃)
<u>Haemophilus influenzae</u> (ハイオグナ-フ <u>influenzae</u>)NCTC 8143	+	+
<u>Haemophilus influenzae</u> (ハイオグナ-フ <u>influenzae</u>)ITM 3837	+	+
<u>Haemophilus influenzae</u> (ハイオグナ-フ <u>argyptius</u>)ITM 859	-	+
<u>Haemophilus parahaemolyticus</u> ITM 402	-	-
<u>Haemophilus parainfluenzae</u> ITM 1094	-	-
<u>Haemophilus aphrophilus</u> NCTC 5906	-	-
<u>Haemophilus ducreyi</u> CIP 542	-	-
<u>Pasteurella multocida</u> NCTC 10322	-	-
<u>Pasteurella picida</u> ATCC 17911	-	-
<u>Actinobacillus lignieresii</u> NCTC 4189	-	-
<u>Actinobacillus actinomycetemcomitans</u> NCTC 9710	-	-
<u>Histophilus ovis</u> HIM 896-7	-	-
<u>Pseudomonas cepacia</u> ATCC 25609	-	-
<u>Actinetobacter calcoaceticus</u> ATCC 23055	-	-
<u>Branhamella catarrhalis</u> LMG 5128	-	-
<u>Bordetella pertussis</u> NCTC 8189	-	-
<u>Escherichia coli</u> B	-	-
<u>Neisseria meningitidis</u> NCTC 10025	-	-

【第1図】

```

AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -50
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -50

TGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTTCGCTTAAGAAGG3AAACCGG -100
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTTCGCTTAAGAAGG3AAACCGG -100

GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGGTCGGA -150
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGGTCGGA -150

GGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGGCATAGCTCAGTTGGT -200
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGGCATAGCTCAGTTGGT -200

AGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTTCGATCCCGTTTGCCT -250
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTTCGATCCCGTTTGCCT -250

CCACCAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTGCTGTTTTTAGCAGCTTAT -300
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CCACCAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTGCTGTTTTTAGCAGCTTAT -300

TTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC

```

【第9図】

```

AAGGATAAGGAA--CTGCGCATTG-GTCTTGTTTAGTCTTGAGAGGTCTT -47
:::::::::::: :::: :::::::::::::: ::::::::::::::::::::
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT -50

GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC -97
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC -100

AGCGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC -147
:::::::::::::::::::::::::::::::::::: :: : :: : ::
AGCGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAAT--TGT -148

ACATTGAAAATTGAATATCTATATCAAAT----- -176
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATCCACGATCTAGAAATAGATT -198

-----AGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGT-AGTATT-AATAAG -218
:::::::::::::::::::::::::::::::::::: : :::: :::: ::
GTAGAAAGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGTGAATATTTAATGAG -248

AGTTTATGACTGAAAGG---TCAGAAAATAA -246
:: : : :::: : : ::::
TTTTCTAGTTTTTAAAGAACTAGGTTAATAA -279

```

【第2図】

```

AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTC AAGTGTCACGCTTATCGGTTGTTGTTAT -50
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTC AAGTGTCACGCTTATCGGTTGTTGTTAT -50

ATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAGGTTTCGCGGG -100
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAGGTTTCGCGGG -100

TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCACCGTCTTGATAAGGCGGGGGTCGTTG -150
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCACCGTCTTGATAAGGCGGGGGTCGTTG -150

GTTCGAATCCAACCAGACCCACCAAGGTTTCCTGAGAGGGAAATGGGGGT -200
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GTTCGAATCCAACCAGACCCACCAAGGTTTCCTGAGAGGGAAATGGGGGT -200

GTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATCGGTTC -250
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATCGGTTC -250

GATCCCGTTACCTCCACCAAAGCCTGTCCAGAGGATGGGTGTGGNNNG- -299
:::::::::::::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
GATCCCGTTACCTCCACCAAGAGCCCGTCTTGAAGATGGGAGCGGGTTGG -300

-----AGACCAG-AAGGCGAGAGAGCAACGTTAGTGCTGCGAGTCAGTG -342
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CAGGCGAGACCAGGAAGGCGAGAGAGCAACGTTAGTGCTGCGAGTCAGTG -350

TTAAGCGTTGGGTTTGGCCGACAGCTATATATGTTCTTTAACAATTTGG -392
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTAAGCGTTGGGTTTGGCCGACAGCTATATATGTTCTTTAACAATTTGG -400

AAGAAGCACAACGTAAAGTGTTTCGTTTAGTAGTCGGCGCGAGTCGATGAA -442
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AAGAAGCACAACGTAAAGTGTTTCGTTTAGTAGTCGACGCGAGTCGATGAA -450

GACGGATACGGGTTGTGATTGCATGATTTTGTTC AAGTCTCAAGAACTG -492
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GACGGATACGGGTTGTGATTGCATGATTTTGTTC AAGTCTCAAGAACTG -500

GCTGGGCGGCCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACTTATGAACGGCACA -542
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GCTGGGCGGCCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACTTATGAACGGCACA -550

AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTTATAG -582
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTTATAG -590

```

【第3図】

```

AGAGAAAGAAGAGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAAACTGAAAAAG -50
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAAACTGAAAA-G -49

ATGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGATTCGCTTAAGAAGAGAATCCG -100
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTTCGCTTAAGAAGGGAACCG -99

GGTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGGTCGG -150
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GGTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGGTCCG -149

AGGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGGGCATAGCTCAGTTG -200
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGG-CATAGCTCAGTTG -198

GTAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTTCGATCCCGTTTGC -250
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GTAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTTCGATCCCGTTTGC -248

CTCCACCAATACTGTACAAATCAAAACGGAAGAATGGAACAGAATCCATT -300
:::::::::::::::: :::::::::: :::: :::: :::: :::: ::::
CTCCACCAAACTTTACAAATGAAAGC--AAG-----TT -280

CAGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAATGCTGATATAATAATCAG -350
:::::::: :::: :::: ::::
-----TGCTGTTTTTAG--CAG -295

CTCGTTTTGATTTGCACAGTAGATAGCAATATCGAACGCATCGATCTTTA -400
:: :::::::::: :::: :::: :::: :::: ::::
CTTATTTTGATTTGCGAAGTAGA-----ATAACGA-CGCATCGATCTTTA -339

ACAAATTGGAAAGCCGAAATCAACAAACAAAGACAAAGCGTTTGTTTTGA -450
:::::::::::::::: :::::::::: :::: :::: :::: ::::
ACAAATTGGAAAGCCGAAATCAACAAACAAAGACAATGAGTTTGTTTTGA -389

TTTTTTATTCTTTGCAAAGGATAAAAAATCGCTCACAAGAGAAAGAAAA -500
:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: :::: ::::::::::::::
TTTTTTATTCTTTGCAAAGGATAAAAAATCTCTCGCAAGAGAAAGAAAA -439

CAAACACAGTATTTGGGTGATGATTGTATCGACTTAACCCGTGAACACAA -550
:::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::::: :::: ::::
CAAACATAGTATTTGGGTGATGATTGTATCGACTTAATCCTGAACACAA -489

AAGGCAGGATTAAGACACAACAAAGCAGTAAGCTTTATCAAAGTAGGAAA -600
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AAGGCAGGATTAAGACACAACAAAGCAGTAAGCTTTATCAAAGTAGGGAT -539

TTCAAGTCTGATGTTCTAGTCAACGGAATGTTAGGCAAAGTCAAAGAAGT -650
:::::::: :::: :::::::::: :::: :::: :::: ::::
TTCAAGTTTGCTTACTTAGTCAACGGGTAGGTAAACGAAGTCAAAGAAGT -589

TCTTGAAATGATAG -664
::::::::::::::::::
TCTTGAAATGATAG -603

```

【第4図】

[illegible]

AC-----GAAG-----TT-----AT-----CTGATTGGCAA---GAA----- -24
 : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
 AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -50

 TCCACAACAAG-TTGTTCCTTGGTAAGAT--GTTTAA-----AAAC-GG -64
 : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
 TGC GGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTGCTTAAGAAGGGAAACCGG -100

 GTCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGTGTGATAACGCGGG-GGTCAT -113
 :
 GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAA-GCGTGAGGTCGG -149

 AAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTT-GGGGCCATAGCTCAGTTGG -162
 :
 AGGTTCAAGTCCTCCAGACCCACCAAGAACGGGGGCATAGCTCAGTTGG -199

 TAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCGACTCTCCTTGGC -212
 :
 TAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTCGATCCGTTTGCC -249

 TCCACCAAGCAAGTTTAAACATCAAAGCATACATAAGCAATTTAAATAAG -262
 :
 TCCACCAA--AACTTTACAAATGAAAGCAAG--TTTGCTGTTTTTAGCAG -295

 ATTTCTTATTTATGCTTT-TATTTTATAAACTGA-CGAAGTTTATAACAT -310
 :
 CTTATTTTGATTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATCTTTAACAAAT -345

 T-----ATTAAACAA-CATAGT--ATGAGTCTGGGTAAATTATTT -347
 : :
 TGGAAAGCCGAAATCAACAAACAAAGACAATGAGTTTGTTTTGATTTTTT -395

 AAT---TCCAACAAATAATTAACCTGGTGTTTGT--ACCCAATACAAACA -392
 : : :
 ATTCTTTGCAAAGGATAAAAAATCTCTCGCAAGAGAAAAGAAACAAACA -445

 CCAA-----AAAGTAAAGAG--AA--CTGAATCAA-----GC- -421
 : :
 TAGTATTTGGGTGATGATTGTATCGACTTAATCCTGAAACACAAAAGGCA -495

 GTA-----AACATAGGTG-AATCGTTA-CACATTACCCATA-CAC- -458
 : : :
 GGATTAAGACACAACAAAGCAGTAAGCTTTATCAAAGTAGGGATTTCAG -545

 -----AC-----CAAAGACTTCCTA---GAAGTCAGACTA---CTTGG -490
 : : :
 TTTGCTTACTTAGTCAACGGGTAGGTAAACGAAGTCAAAGAGTTCTTGA -595

 GGTTGTAT -498
 : : :
 AATGATAG -603

【第6図】

```

C----- -1
:
CTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGA -50
-----CAAATAA----AG----AC-----ATCAC----- -18
      :::  :::  ::  ::  ::::
AGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTA -100
-----AAGTA-----CTCACACAGATTGTTTGATTGTTTT -48
      :::  :::::  :::::
CCTTAAAGAAGCGTACTTTGTAGTGCTCACACAGATTGTCTGATAGAAAG -150
AGA----CAAGTCG-----GAATA---- -63
      ::  ::::  :::::
TGAAAAGCAAGGCGTTTACGCGTTGGGAGTGAGGCTGAAGAGAATAAGGC -200
CAT---CTTT-----AAATGT----- -76
:  :  ::::  :::::
CGTTGCGTTTCTATTAATGAAAGCTCACCCCTACACGAAATATCACGCAA -250
-----TGTCCCCATCTGTCTAGAGGCCTAGGACAT -106
      :::::  ::  :::::  :::::
CGCGTGATAAGCAATTTTCGTGTCCCTTC-GTCTAGAGGCCAGGACAC -299
CGCCCTTTCACGGCGGTAACCGGGGTTTCGAANCCCC--GTGGACGCCATC -154
:::  :::  :::  :::  :::  :::  :::  :::  :::  :::
CGCCCTTTCACGGCGGTAACAGGGGTTTCGAATCCCCTAGGGGACGCCA-C -348
TAAAGATGATTTTT-ATTGTCTTATGTT--CTTTAAAAAATAGAAACAA -201
:  :  ::  ::  :  :  :  :  :  :  :::  :  :  :
TT--GCTGTTTTGTGAGTGAAAGTCGCCGACCTTAATATCTCAAACTCA -396
GCT----GAAACTGAGAGATTTTCTAAAGTAGAAAGTCTGAGT-AATCT -246
::  :  :  :  ::::  ::  :  :::  :::  :  :  :
TCTTCGGGTGATGTTTGAGATNTTGTCTTTAAAAATCTGGATCAAGCT -446
AAAATCTTAG---CTGAACAAAAGCAGCTAAGTGTTTAGTCTAAATCATT -293
:::  :  :  :::::  ::  :  ::  :::  :::
GAAATTGAACACTGAACAACGAGAGTTGTTTCGTG-AGTCTCTCAAATT -495
AACCACAAGTATATCAATATGCCTCGGCATAATAAAATACTTGAGGTTG -343
:  :::  ::  :::  :::  ::  :::  :::  :::
TTCG-CAACACGAT---GATGAATCGA----AAGAAACATCTTCGGGTTG -537
TAT -346
:
TGA -540

```

【第7図】

ACGAAGTTATCTGATTGGCAAGAATCCACAACAAGTTGTTCTTTGGTAAG -50
::: ::: : ::
ACGAGATTATCTGATTGGCAAGAATCCACAACAAGTTGTTCTTAG-TAGT -49

ATGTTTAAAAACGGGTCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGTGTGATA -100
: : ::: :::::
GTAAGTTAAATTGGGTCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGCCTTGATA -99

ACGCGGGGGTCATAAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGCCA -150
: ::: :
AGGCGGGGGTCATAAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGTTA -149

TAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCG -200
:::
TAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCG -199

ACTCTCCTTGGCTCCACCAAGCAAGTTTAA--ACATCAAAGCATACATAA -248
::::::::: ::::::::::: : : : : : : : : : : : :
ACTCTCCTTAAGTCCACCACTTACAATAAATGAGAACTAAGCAATCAAAT -249

GCAAT----TAAATAAGATTTCTTATTTATGCTTT--TATTTTA--TA -289
:
TAGATAACATAAAATTAGATTTCTTACTTCTACTTTATGTAGATGACTTA -299

-----AACTGACGAAGTTTATAACA-TTATTTAAACAACATAG-TATGAGT -332
:
CAATTAAGTGAAGTTAATTTCAATTATTTAAACAACGTATATATGAGT -349

CTGGGTTAATTATTTAATTCCAACAAATAATTAACCTGGTGTGTTGTAC-C -381
::: : : : :
CTGGGTTAATTATTTAATTCCAACAAATAATTAACCATTCGGTCATACTC -399

CA-----ATACAAACACCAAA-----A -398
:
CACATCAAGCATATAAAGTTAAAACTTTTAGTATTGATGATGATCGGATA -449

AAGTAAAGAGAACTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACATT -448
:::
AAGTAAAGAGAACTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACATT -499

ACCCATACACACCAAAGACTTCCTAGAAGTCAGACTACTTGGGGTTGTAT -498
:::
ACCCATACACACCAAAGACTTCCTAGAAGTCAGACTACTTGGGGTTGTAT -549

【第8図】

```

CTGAAGACGAGAGACAGCGAGTGCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG -50
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CCCAAGACGAGAGACAGCGAGTGCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG -50

ACAAGATTAAAAACGAAGCGAAAGCAACGTTGAAAAATAAACGTTAAAAG -100
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ACAAGATTAAAAACGAAGCGAAAGCAACGTTGAAAAATAAACGTTAAAAG -100

ATAAAAAGAAAATAGAGTATCTTTAATTGATGTCCCATCGTCTAGAGGC -150
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATAAAAAGAAAATAGAGTATCTTTAATTGATGTCCCATCGTCTAGAGGC -150

CTAGGACATCGCCCTTTCACGGCGGTAACCGGGGTTTGAATCCCCGTGGG -200
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CTAGGACATCGCCCTTTCACGGCGGTAACCGGGGTTTGAATCCCCGTGGG -200

ACGCCAATTAAAGATAACTTTATTAGATTGTCTTACTGTTCTTTAAATTT -250
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ACGCCANNNNNNNNNNNNTTTATTAGATTGTCTTACTGTTCTTTAAAAAA -250

TTGGAAACAAGCTGAAAACAAGAGATTTTCGAGAGAAAGTCTGAGTAGGC -300
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTGGAAACAAGCTGAAAACAAGAGATTTTCGAGAGAAAGTCTGAGTAGGC -300

AAGATAGGAAAGTGAGAGGAGGGAAGTGAAGGGAAGTCTAAAAACAAA -350
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AAGACAGGAAAGTGAAAAGAGGGAAGTGAAGGGAAGTCTAAAAACAAA -350

ACCTGTTTTGCATAAAA-TCTTGATTGAACAAAAGCAATCAAGTGTTTAG -399
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
-CCTGTTTTGTAAAAAATCTTGATTGAACAAAAGTAATCAAGTGTTTAG -399

TTGAATGAAAATACGCATCAAATTGACCGCACTTTGAAGTGAAAACCTTA -449
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTGAATTAA--TGAGGCTGAAAGTGCAGTCAAAGTACGGTATCTATTTTA -447

-AGTGA--TTGAAAACATTTGAGGTGAT -474
: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TATTGAGTTTTGAAAACATTTGANNNNNN -476

```



```

TAAAATCTAAAGCAAGTATATAAAGTAGATTAAATATAAAATACAAACTC -50
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TAAAATCTAAAGCAAGTATATAAAGTAGATTAAATATAAAATACAAACTC -50

TATACTTAGATTTATTTTTATCTTTAACTATAAAAGAATATACTTTAATA -100
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TATACTTAGATTTATTTTTATCTTTAACTATAAAAGAATATACTTTAATA -100

AATATAAATAACATATACATTATGTATTTATATTTATAATGAGATTATTT -150
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AATATAAATAACATATACATTATGTATTTATATTTATAATGAGATTATTT -150

AATATATATGCTTCCTTTAGGTTTTAAACCTAAATGTTCTTTTTAATTAT -200
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AATATATATGCTTCCTTTAGGTTTTAAACCTAAATGTTCTTTTTAATTAT -200

CATTGTTAAGAGTCACAAGCAAGTTTTAATAAAAACAATTTTACAGGACT -250
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CATTGTTAAGAGTCACAAGCAAGTTTTAATAAAAACAATTTTACAGGACT -250

TGTTAAAGGATAAAACCTATTTATCTTTTCTTTGGTTTAACTTATATCTT -300
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGTTAAAGGATAAAACCTATTTATCTTTTCTTTGGTTTAACTTATATCTT -300

TTAATTATCTTTATTTCTATAATAAAGAGAATATTAGATTTAAGATTTAT -350
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTAATTATCTTTATTTCTATAATAAAGAGAATATTAGATTTAAGATTTAT -350

AAATTAAAGACAAGTTTCAAACCTCACAGCTTAGTTGAGACTAAATCATTT -400
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AAATTAAAGACAAGTTTCAAACCTCACAGCTTAGTTGAGACTAAATCATTT -400

AGTTTTATATTAAGTGTTTGAATGCTTTCCGCTTAAAGATAAAGAAGTCT -450
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGTTTTATATTAAGTGTTTGAATGCTTTCCGCTTAAAGATAAAGAAGTCT -450

TATCATAAAAACTTTAACAAGGAAGTGATGCGTTTTAGAATCAATAATAA -500
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TATCATAAAAACTTTAACAAGGAAGTGATGCGTTTTAGAATCAATAATAA -500

AAGGTAAAAAA -511
::::::::::::
AAGGTAAAAAA -511

```

フロントページの続き

(72)発明者 バン・フーベルスウイン、ヒューホ
ベルギー国、バー—9288・ラルネ、コ
ルマンストラート・62

(56)参考文献 特表 昭60-501339 (J P, A)
「生化学辞典 第1版」東京化学同人
(昭59. 4. 10) P. 1343
Mol. Gen. Genet., 193
(1984) P. 427-430